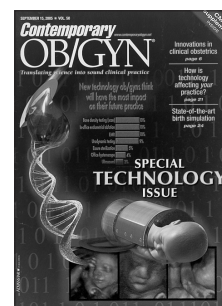


Innovazioni tecnologiche in clinica ostetrica

JOONG SHIN PARK, ERROL R. NORWITZ



La nuova tecnologia è in volo per aiutare a identificare la rottura prematura pretermine delle membrane, migliorare l'imaging ecografico, fornire lo screening genetico prenatale non-invasivo, accelerare la diagnosi di infezione amniotica.

Assistere una gestante è ad un tempo un enorme privilegio e una pesante responsabilità.

Come è noto, ci sono molte situazioni, nella pratica quotidiana, in cui ci troviamo in una "zona senza dati", dovendo dare consigli e prendere decisioni senza poterci avvalere di solidi dati basati sulle prove. In queste circostanze devono guidarci l'esperienza clinica e l'arte della pratica medica.

In nessun campo ciò è più evidente che nella clinica ostetrica, dove molti fondamentali interrogativi rimangono senza risposta,

Il nostro obiettivo è quello di rivedere qui una serie di dispositivi e di innovazioni tecniche che sono attualmente in via di sviluppo per aiutare il clinico nell'assistere la gestante e il suo feto.

Test biochimici per la rottura prematura pretermine delle membrane

La rottura prematura pretermine delle membrane (pPROM, *preterm Premature Rupture Of the fetal Membranes*), cioè la rottura delle membrane prima della 37^a settimana di gestazione, complica fino al 12% di tutte le gravidanze (1).

Naturalmente, se si potesse vedere il liquido amniotico fluire dall'orifizio cervicale esterno, la diagnosi ne risulterebbe confermata, ma ciò accade raramente.

Un dye-test dell'amnios è il gold standard per la conferma della pPROM, ma è una procedura invasiva e, come tale, si accompagna a emorragie, infezioni, rottura iatrogena delle membrane, e aborto. Tra gli altri test attualmente disponibili vi sono una raccolta di liquido amniotico nel fornice posteriore, un test alla "nitrazina" positivo, e il *ferning* (cristallizzazione a foglia di felce) del liquido vaginale (Tab. 1). La sola ecografia non può confermare la diagnosi, ma in appropriate situazioni cliniche contribuisce a suggerirla. Tutti questi test clinici hanno alcune limitazioni in termini di accuratezza, rischi, costo, e facilità di esecuzione (6-14). Inoltre, essi diventano sempre meno precisi quando dalla rottura delle membrane è trascorsa più di 1 ora.

Chiaramente, allora, c'è urgente necessità di un test rapido, accurato ed economico per la pPROM. Nel tentativo di confermare la diagnosi di pPROM sono stati misurati nel liquido vaginale numerosi marker biochimici – tra cui fibronectina fetale (fFN, *fetal FibroNectin*), alfa-fetoproteina, prolattina, fattore di crescita insulino-simile e lattogeno placentare umano – con risultati variabili (5, 15-21). Un test diagnostico largamente usato in Europa e recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) è l'AmniSure (N-Dia, Inc., Cambridge, MA). Si tratta di immunoassay semplice, di facile esecuzione, rapido (5-10 minuti) e non-invasivo, che non richiede l'esame con lo speculum.

Dr. PARK is Associate Professor in the Department of Obstetrics and Gynecology
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea
Dr. Norwitz is Associate Professor in the Department of Obstetrics, Gynecology and
Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn

(Da "Contemporary Ob/Gyn - September 15, vol. 50, 2005")

© Copyright 2006, CIC Edizioni Internazionali, Roma

TABELLA 1 - TEST CLINICI PER CONFERMARE LA DIAGNOSI DI ROTTURA DELLE MEMBRANE.

Metodo	Tecnica	Accuratezza	Inconvenienti
Raccolta	Visualizzazione di una raccolta vaginale nel fornice posteriore	Impreciso	Richiede l'esame con lo speculum. Soggettivo. Urine, sperma e altri liquidi possono facilmente essere presi per liquido amniotico e viceversa.
Test alla nitrazina	Il liquido amniotico è alcalino e, come tale, vira al blu l'indicatore di pH alla nitrazina	Sensibilità: 90,7% Specificità: 77,2% Falsi positivi: 17,4% Falsi negativi: 12,9%	Per la raccolta del campione è necessario l'esame con lo speculum. Risultati falsamente positivi possono essere causati da cervicite, vaginite (vaginosi batterica o <i>Trichomonas</i>), urine alcaline, sangue, sperma o antisettici.
Ferning	Quadro di arborizzazione (cristallizzazione) del liquido amniotico secco, quale osservabile attraverso un microscopio	Sensibilità: 98,0% (in travaglio) e 51,4% (non in travaglio) Specificità: 88,2% (in travaglio) e 70,8% (non in travaglio) Falsi positivi: 5-30% Falsi negativi: 12,9%	Per la raccolta del campione è necessario l'esame con lo speculum. Richiede un microscopio. Risultati falsamente positivi possono essere dovuti a contaminazione del vetrino con impronte digitali o con sperma e muco cervicale. Risultati falsamente negativi possono essere causati da tamponi asciutti, contaminazione con sangue e perdite.
Ecografia	Può identificare un oligoidramnios, indicando una minore quantità di liquido amniotico, a causa della rottura delle membrane	Se usato da solo, il test non è affidabile. Usato unicamente per confermare la diagnosi	Prende molto tempo. Richiede un ecografo ed esperienza. Può identificare soltanto perdite significative di liquido amniotico, ma non può confermarne la causa.
Infusione di colorante nella cavità amniotica	Instillazione di indaco carminio diluito nella cavità amniotica, e conferma della rottura delle membrane attraverso la documentazione della perdita del colorante in vagina (colorazione del tampone) entro 20-30 minuti	"Gold standard" per la diagnosi di rottura delle membrane	Preciso, ma altamente invasivo (richiede l'amniocentesi). Costoso. L'amniocentesi si accompagna a rischi per la gravidanza, tra cui emorragia, infezione, rottura iatrogena delle membrane, e perdita della gravidanza (circa 1 caso su 270).

Fonte: voci bibliografiche 6-13.

Il test identifica quantità in tracce di alfa-microglobulina 1 placentare (PAMG-1, *Placental Alpha Microglobulin-1*), una proteina che si trova in abbondanti quantità nel liquido amniotico (2.000-25.000 ng/mL) ma è presente in concentrazioni di gran lunga inferiori nel sangue materno (5-25 ng/mL). In assenza di rottura delle membrane, la proteina si trova nelle secrezioni cervico-vaginali in concentrazioni ancora più basse (0,05-0,2 ng/mL). Questa differenza di 10.000 volte tra la concentrazione nel liquido amniotico e nelle secrezioni cervico-vaginali fa della PAMG-1 un marker assai attraente di pPROM (22-25). La soglia minima di rilevazione dell'immunoassay AmniSure è di 5 ng/mL, sufficientemente sensibile per identificare la pPROM con una accuratezza di circa il 99% (25). La tecnica di esecuzione di questo test è descritta brevemente nella Figura 1.

Ecografia tri- e quadridimensionale

L'ecografia è da lungo tempo impiegata in ostetricia per documentare il numero di feti, confermare l'età gestazionale, identificare anomalie strutturali fetali e/o marker di aneuploidia fetale, e accertare il benessere del feto.

L'ecografia tridimensionale consiste di tre fasi: acquisizione del volume mediante sistemi di scansione interni (automatizzati) o esterni (a mano libera), esposizione del volume, e manipolazione del volume.

Analogamente all'ecografia bidimensionale, la qualità dell'imaging tridimensionale dipende dalla presenza di una quantità di liquido amniotico sufficiente per creare una adeguata finestra acustica.

Sebbene l'ecografia tridimensionale sia disponibile fin dagli inizi degli anni '90, essa non ha ancora raggiunto il massimo della sua potenzialità. Oltre alla rapida acquisizione delle immagini che possono essere ricostruite e manipolate, essa ha altri potenziali vantaggi.

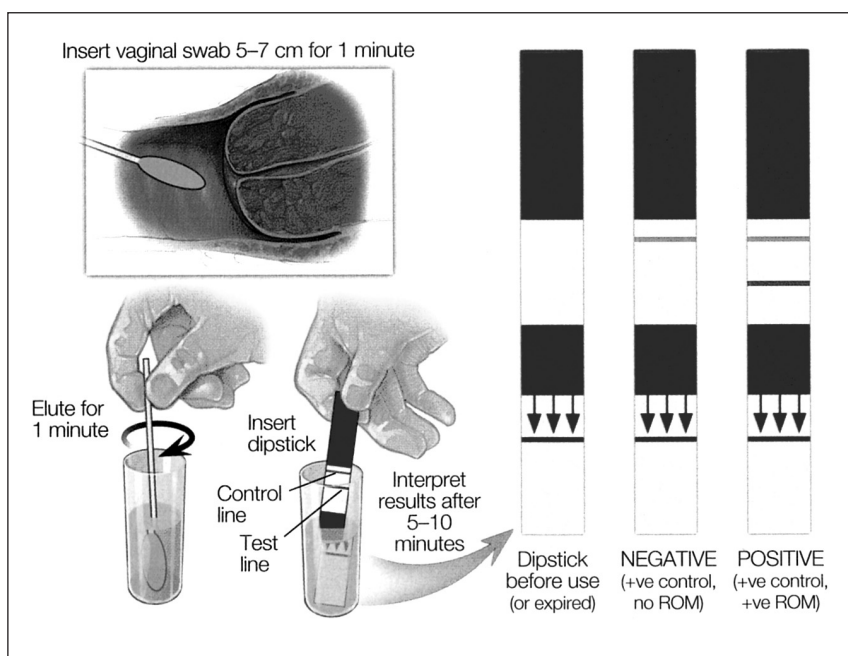


Fig. 1 - Test AmniSure per la diagnosi di pPROM.

- La modalità di rendere visibili le superfici fornisce chiare immagini di molte strutture fetali (Fig. 2).
- L'ecografia transvaginale tridimensionale può risultare utile nella valutazione della gravidanza iniziale attraverso la esatta valutazione del sacco gestazionale, del sacco vitellino e della lunghezza vertice-sacro.
- L'ecografia tridimensionale può essere usata anche per misurare il volume dei tessuti.
- Le moderne reti di telecomunicazione rendono possibile trasferire i dati sui volumi immagazzinati dalla ecografia tridimensionale a centri lontani, per la loro rivalutazione e/o per la richiesta di una seconda opinione di uno specialista.

Sebbene la sostituzione dell'ecografia bidimensionale non sia probabile in un prossimo futuro, l'ecografia tridimensionale rappresenta comunque un valido complemento nell'imaging ostetrico. Con il progressivo miglioramento della tecnologia, è probabile che l'ecografia fetale evolva fino a somigliare sempre più all'imaging TAC e RMN.

Progressi nella diagnosi prenatale

L'analisi genetica sta offrendo attualmente alla maggior parte delle gestanti la possibilità di valutare il proprio rischio, legato all'età, di avere un feto con alterazioni cromosomiche, la più frequente delle quali è la trisomia 21 (sindrome di Down). Finora, il solo modo di raccogliere le cellule fetali per l'analisi decisiva è mediante l'amniocentesi o il prelievo di villi coriali. Sebbene precisi e affidabili, questi metodi invasivi comportano dei rischi, tra cui emorragia, infezione, rottura iatrogena delle membrane e aborto. Il rischio, legato alla procedura, di perdere una gravidanza per l'amniocentesi routinaria eseguita nel 2° trimestre, alla 15^a-20^a settimana, è dello 0,2-0,5% (32). Il rischio di perdere una gravidanza con la villocentesi è dell'1-2% (33).

Per ridurre al minimo questi rischi, i ricercatori stanno tentando di sviluppare test genetici non-invasivi per accertare in maniera definitiva una eventuale aneuploidia fetale. Cellule fetali sono presenti nella circolazione materna in concentrazioni di circa 1 cellula ogni 30 materne (34). Durante tutta la gravidanza, nella circolazione materna è stato trovato anche, in concentrazioni significative, DNA libero fetale. In effetti, il 3-6% di tutto il DNA libero nel siero materno è di origine fetale, ma questa cifra può raggiungere il 20% in caso di pre-eclampsia o di emorragia fetto-materna. Per l'analisi genetica il DNA fetale libero può essere superiore alle cellule, perché è relativamente abbondante, non richiede una eccessiva purificazione, e la sua breve emivita preclude efficacemente la contaminazione da parte di una precedente gravidanza (35). Tuttavia, recenti tentativi di identificare e isolare cellule fetali, DNA fetale o entrambi dalla circolazione materna, da impiegare nei test genetici per la diagnosi di aneuploidia, sono in gran parte falliti (36, 37).

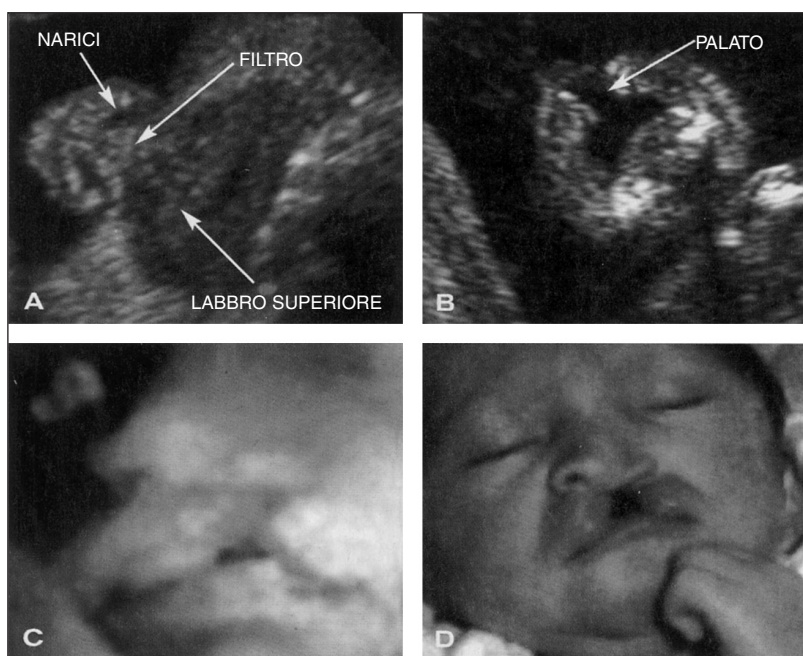


Fig. 2 - Diagnosi prenatale di labioschisi fetale.

(A) Al momento della valutazione morfologica del feto, alla 18^a-20^a settimana di gestazione, va acquisita routinariamente una adeguata veduta del labbro superiore, del filtro e delle narici. (B) La diagnosi di labioschisi e/o palatoschisi può essere posta nel 26-72% dei casi per mezzo dell'ecografia bidimensionale, sebbene le immagini possano apparire più drammatiche di quanto non sia la realtà, a causa della incapacità di risoluzione dei tessuti molli del viso (26-28). (C) L'ecografia tridimensionale può fornire immagini superiori del volto fetale, per aiutare i genitori a prepararsi psicologicamente alla nascita di un bambino con un difetto facciale. Con l'impiego dell'ecografia tridimensionale, le immagini del volto fetale ottenute prima del parto possono essere molto simili all'aspetto reale del volto (D).

Intorno al momento dell'impianto (7-10 giorni dopo il concepimento), l'embrione si differenzia in uno strato trofodermico che diventerà la placenta e le membrane fetali, e in una massa cellulare interna che costituirà l'embrione propriamente detto. Intorno alla 3^a settimana dopo il concepimento, cellule del trofoblasto si liberano dal polo anti-impianto dell'embrione nella cavità uterina e si scaricano nel muco cervicale. Molti ricercatori hanno cercato di isolare queste cellule trofoblastiche dalle perdite cervico-vaginali di donne all'inizio della gestazione, e di usarle per il test genetico decisivo (38-41). Studi preliminari hanno dimostrato che in effetti è possibile isolare le cellule del trofoblasto dalla cervice uterina mediante lavaggio del canale cervicale a 7-10,5 settimane di gestazione (38).

Uno studio più recente ha dimostrato che le cellule del trofoblasto possono essere identificate e isolate anche dall'orifizio cervicale esterno di donne alla 5^a-12^a settimana di gestazione usando un cytobrush, una procedura chiamata a volte Pap-test genetico (41). In quest'ultimo studio, cellule trofoblastiche sono state isolate dall'86% (195/227) dei campioni con metodo immunocitochimico con anticorpi specifici per il trofoblasto, e l'analisi genetica concordava con la cariotipizzazione del tessuto placentare mediante villocentesi nel 95% dei casi (186/195) (41). La capacità di raccogliere con successo cellule trofoblastiche dalle perdite cervicovaginali di donne all'inizio della gestazione e di sottoporle all'analisi genetica (analoga a una villocentesi precoce) può costituire un semplice, affidabile, non-invasivo, eppur decisivo test per l'aneuploidia fetale in una gravidanza unica, senza esporre a rischi la madre o il feto.

Applicazione della tecnologia proteomica all'ostetricia

La nascita pretermine complica dal 7% al 10% di tutti i parti ed è responsabile di oltre l'85% di tutta la mortalità, morbosità perinatale (42, 44). Il travaglio pretermine è probabilmente una sindrome, piuttosto che un unico disturbo, poiché le sue cause variano ampiamente. Circa il 20% di tutti i parti pretermine sono iatrogeni e vengono espletati per indicazioni materne o fetali. Dei rimanenti casi, circa il 20-25% sono dovuti a corioamnionite, il 30% si verificano in situazioni di pPROM, e un altro 25-30% restano inspiegati (45, 46).

Quella di infezione amniotica rimane una diagnosi clinica, quale rivelata da tachicardia fetale e materna, dolenzia uterina e/o febbre materna. Livelli elevati di glucosio, leucociti, e di alcune citochine (come l'interleuchina-6) nel liquido amniotico o una colorazione Gram-positiva possono suggerire una diagnosi, ma non sono decisivi. Per la diagnosi del disturbo, il gold standard è una coltura del liquido amniotico positiva. Purtroppo, prima di ottenere la risposta sono necessari alcuni giorni, e in questo periodo l'identificazione precoce di una in-

fiammazione intra-amniotica permette all'ostetrico di accelerare il parto, allontanando in tal modo il feto da un ambiente intrauterino ostile. A questo fine, i ricercatori hanno recentemente impiegato la tecnologia proteomica per identificare l'infiammazione intra-amniotica nel liquido amniotico (47, 49).

Si chiama *proteomica* lo studio del complemento proteico di un compartimento liquido, tessuto o linea cellulare per mezzo di tecnologie analitiche proteomiche quali la gel-elettroforesi bidimensionale o la spettrometria di massa e/o tecniche di identificazione basate su microarray di proteine. La proteomica si è rivelata una promettente nuova tecnologia nella scienza della riproduzione, con il potenziale di definire meglio la fisiopatologia delle complicanze della gravidanza, migliorare la diagnosi di condizioni in rapporto con la gestazione quali l'infezione amniotica e la pre-eclampsia, e monitorare la progressione della malattia. Ad esempio, i ricercatori hanno recentemente impiegato la SELDI-TOF-MS (*Surface Enhancer Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight – Mass Spectroscopy*), una modalità di spettrometria di massa con superficie di deassorbimento/ionizzazione migliorata, indotta da fasci di luce laser, della proteina co-cristallizzata con matrici organiche idonee, interfacciata con analizzatori a "tempo di volo", per identificare biomarker proteici discriminatori nel liquor e nelle urine di donne con pre-eclampsia (50-51).

La spettrometria di massa separa le proteine a seconda del loro rapporto massa/carica (m/z) e può identificare quelle che sono presenti in concentrazioni estremamente piccole (10^{-12} M) in una soluzione biologica complessa. La SELDI-TOF-MS è una tecnologia proteomica sviluppata recentemente e che combina la cromatografia con la spettrometria di massa. Il vantaggio di questo approccio è la sua semplicità tecnica, la velocità di screening, la capacità di usare piccole quantità (2-10 μ L) di soluzioni biologiche grezze. Ogni molecola proteica nel campione biologico viene ionizzata, gli ioni vengono spinti in un analizzatore di massa da un campo elettrico, e separati a seconda del loro rapporto m/z .

Un analizzatore a tempo di volo si basa sul principio che, quando accelerata da un voltaggio costante, la velocità con cui uno ione raggiunge il dettore è determinata dalla sua massa. La capacità di questa tecnologia di far sì che le singole proteine si separino, è migliorata grazie all'aiuto di varie superfici attive dei microarray di proteine ProteoChip, che sono in grado di agire in maniera differenziale con le proteine in base a interazioni idrofobiche, di scambio ionico, di affinità per i metalli, o antigene-anticorpo.

In breve, un campione biologico non diluito è posto su una piccola area (spot) di un array ProteoChip, alla cui superficie le proteine possono legarsi. Le proteine vengono poi sottoposte a spettrometria di massa dopo co-cristallizzazione con molecole o con una matrice che assorbono energia (Fig. 3). Le uscite della SELDI-TOF-MS sono sequenze cartesiane di numeri con i rapporti m/z sull'asse X e l'intensità dei picchi sull'asse Y. Un tracciato rappresentativo di SELDI-TOF-MS è mostrato nella Figura 4. Usando questa tecnologia, i ricercatori hanno

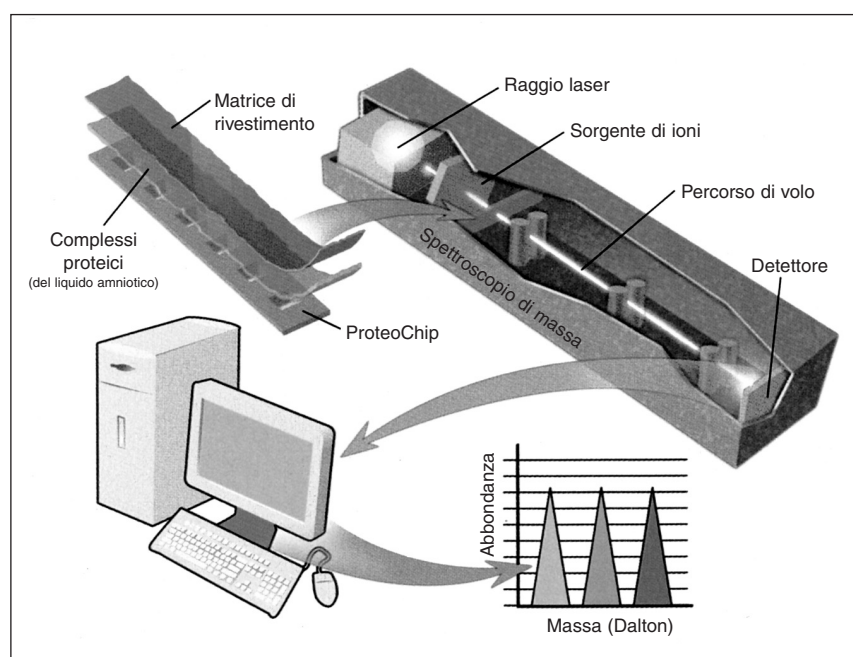


Fig. 3 - Tecnologia SELDI-TOF-MS. Un campione biologico non diluito (in questo caso, liquido amniotico) viene posto su uno spot di un array ProteoChip, e si lascia che le proteine in esso contenute si leghino alla superficie. Le proteine sono co-cristallizzate con molecole che assorbono energia (matrice di rivestimento), ionizzate, spinte da un campo elettrico nell'analizzatore di uno spettrometro di massa, e risolte da questo a seconda del loro rapporto m/z . I dati della spettrometria di massa vengono poi interpretati da un programma computerizzato, che genera un tracciato quale quello illustrato nella Figura 4.

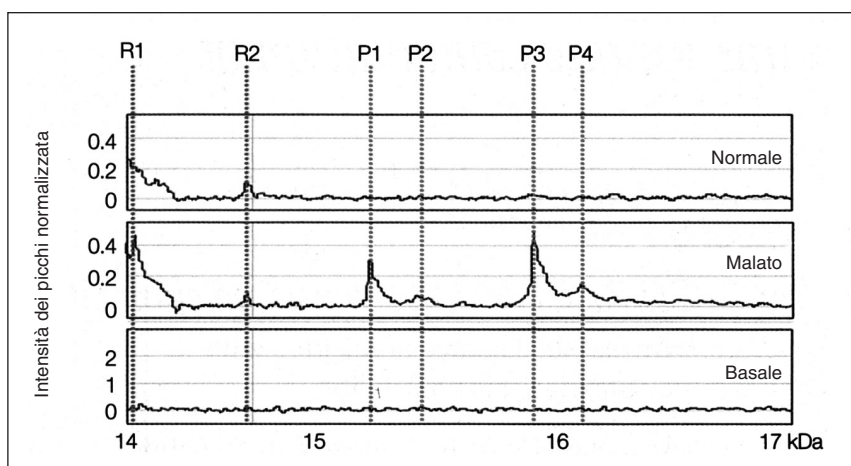


Fig. 4 - Tracciato rappresentativo di SELDI-TOF-MS. Quattro picchi proteici sono evidenti nel tracciato "malato". Questi picchi proteici discriminatori (marcati P1-P4) indicano la presenza nel liquido amniotico di composti che segnalano la presenza di una infiammazione intrauterina. Essi non sono presenti nei tracciati "normale" e "basale". Due picchi proteici sono presenti nei tracciati "malato" e "normale", ma non in quello "basale". Sono questi i picchi di riferimento (marcati R1 e R2).

recentemente identificato distinti biomarker nel liquido amniotico di donne con infiammazione uterina da travaglio pretermine, che sembra essere predittivo di parto pretermine e danno fetale (49-51). Sebbene per confermare questi risultati siano necessari ulteriori studi, la SELDI-TOF-MS può rappresentare una tecnica accurata, rapida (10-15 minuti) e riproducibile per la diagnosi di una infiammazione iniziale intra-amniotica in situazione di travaglio pretermine e/o di pPROM.

Sebbene cerchiamo di dare alle nostre pazienti una esperienza del parto positiva, obiettivi primari dell'assistenza ante-partum e post-partum sono una madre sana e un bambino sano. Probabilmente, lo sviluppo di dispositivi e tecnologie nuove migliorerà la capacità degli ostetrici di raggiungere nei prossimi anni entrambi questi obiettivi.

Bibliografia

1. ALEXANDER JM, COX SM: *Clinical course of premature rupture of the membranes*. Semin Perinatol 1996; 20: 369-374.
2. PHILIPSON EH, HOFFMAN DS, HANSEN GO, et al.: *Preterm premature rupture of membranes: experience with latent periods in excess of seven days*. Am J Perinatol 1994; 11: 416-419.
3. MERCER BM, GOLDENBERG RL, MEIS PJ, et al.: *The Preterm Prediction Study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing*. The NICHD Maternal Fetal Medicine Units Network. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 738-745.
4. FRENCH JI, MCGREGOR JA.: *The pathobiology of premature rupture of membranes*. Semin Perinatol. 1996; 20: 344-368.
5. LOCKWOOD CJ, WEIN R, CHIEN D, et al.: *Fetal membrane rupture is associated with the presence of insulin-like growth factor binding protein-1 in vaginal secretions*. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 146-150.
6. GORODESKI IG, HAIMOVITZ L, BAHARI CM.: *Reevaluation of the pH, ferning and Nile blue sulphate staining methods in pregnant women with premature rupture of the fetal membranes*. J Perinat Med 1982; 10: 286-292.
7. FRIEDMAN ML, McELIN TW.: *Diagnosis of ruptured fetal membranes*. Am J Obstet Gynecol 1969; 104: 544-550.
8. LODEIRO JG, HSIEH KA, BYERS JH, et al.: *The fingerprint, a false positive fern test*. Obstet Gynecol 1989; 73: 873-874.
9. MCGREGOR JA, JOHNSON S.: *"Fig Leaf" ferning and positive nitrazine testing: semen as a cause of misdiagnosis of premature rupture of membranes*. Am J Obstet Gynecol 1985; 151: 1142-1143.
10. DE HANN HH, OFFERMANS PM, SMITS H, et al.: *Value of the fern test to confirm or reject the diagnosis of ruptured membranes is modest in nonlaboring women presenting with nonspecific vaginal fluid loss*. Am J Perinatol. 1994; 11: 46-50.
11. REECE EA, CHERVENAK FA, MOYA FR, et al.: *Amniotic fluid arborization: effect of blood, meconium, and pH alterations*. Obstet Gynecol 1984; 64: 248-250.
12. ROSEMOND RL, LOMBARDI SJ, BOEHM FH.: *Ferning of amniotic fluid contaminated with blood*. Obstet Gynecol. 1990; 75: 338-40.
13. SMITH RP.: *A technique for the detection of rupture of the membranes: a review and preliminary report*. Obstet Gynecol. 1976; 48: 172-176.
14. ATLAY RD, SUTHERST JR.: *Premature rupture of the fetal membranes confirmed by intra-amniotic injection of dye (Evans blue T-1824)*. Am J Obstet Gynecol 1970; 108: 993-994.
15. HUBER JF, BISCHOF P, EXTERMANN P, et al.: *Are vaginal fluid concentrations of prolactin, alpha-fetoprotein and human placental lactogen useful for diagnosing ruptured membranes?* Br J Obstet Gynecol 1983; 90: 1183-1185.
16. ROCHELSON BL.: *Are vaginal fluid concentrations of prolactin, alpha-fetoprotein and human placenta lactogen useful for diagnosing ruptured membranes?* Br J Obstet Gynecol 1985; 92: 427.
17. PHOCAS I, SARANDAKOU A, KONTORAVDIS A et al.: *Vaginal fluid prolactin: a reliable marker for the diagnosis of prematurely*

- ruptured membranes. Comparison with vaginal fluid alpha-fetoprotein and placental lactogen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1989; 31: 133-141.
18. GARITE TJ, GOCKE SE: *Diagnosis of preterm rupture of membranes: is testing for alpha fetoprotein better than ferning or nitrazine.* Am J Perinatol 1990; 7: 276-278.
 19. GAUCHERAND P, GUIBAUD S, AWADA A et al.: *Comparative study of three amniotic fluid markers in premature rupture of membranes: fetal fibronectin, alpha-fetoprotein, di amino-oxylase.* Acta Obstet Gynecol Scand 1995; 74: 118-121.
 20. KISHIDA T, YAMADA H, NEGISHI H, et al.: *Diagnosis of premature rupture of the membranes in preterm patients, using an improved AFP kit: companson with ROM check and/or nitrazine test.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1996; 69: 77-82.
 21. NI CY, JIA WX, YI WM, et al.: *Practicability of using vaginal fluid markers in detecting premature rupture of membranes.* Ann Clin Biochem 2003; 40: 542-545.
 22. PETRUNIN DD: *Immunochemical identification of organ specific human placental alpha-globulin and its concentration in amniotic fluid.* Akush Ginekol [Russian] 1977; 1: 64-65.
 23. BOLTOVSKAYA MN, ZARAIKY EL, FUKS BB, et al.: *Histochemical and clinico-diagnostic study of the placental alpha-microglobulin [PAMG-1] using monoclonal antibodies.* Exp Biol Med [Russian], 1991; 10: 397-400.
 24. TKACHENKO OA, PETRUNIN DD: *Immunochemical studies of the system of specific proteins of the human placenta.* Vestn Ross Akad Med Nauk [Russian] 1995; 3: 40-44.
 25. COUSINS LM, SMOK D, LOVETT SM, et al.: *AmniSure Placental Alpha Microglobulin-1 Rapid Immunoassay versus Standard Diagnostic Methods for Detection of Rupture of Membranes.* Am J Perinatol 2005; 22: 317-320.
 26. CLEMENTI M, TENCONI R, BIANCHI F, et al.: *Evaluation of prenatal diagnosis of cleft lip with or without cleft palate and cleft palate by ultrasound: experience from 20 European registries.* EUROSCAN study group. Prenat Diagn 2000; 20: 870-75.
 27. DAVALBHAKTA A, HALL PM: *The impact of antenatal diagnosis on the effectiveness and timing of counseling for cleft lip and palate.* Br J Plastic Surg 2000; 53: 298-301.
 28. ROBINSON JN, McELRATH TF, BENSON CB, et al.: *Prenatal ultrasonography and the diagnosis of fetal cleft lip.* J Ultrasound Med 2001; 20: 1165-1170.
 29. BRADBURY ET, HEWISON J: *Early parental adjustment to visible congenital disfigurement.* Child Care Health Dev 1994; 20: 251-266.
 30. ROVAS L, SLADKEVICIUS P, STROBEL E, et al.: *Intraobserver and interobserver reproducibility of threedimensional gray-scale and power Doppler ultrasound examinations of the cervix in pregnant women.* Ultrasaund Obstet Gynecol 2005; 26: 132-137.
 31. SCHUCHTER K, METZENBAUER M, HAFNER E, et al.: *Uterine artery Doppler and placental volume in the first trimester in the prediction of pregnancy complications.* Ultrasound Obstet Gynecol 2001; 18: 590-592.
 32. SEEDS JW: *Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe?* Am J Obatet Gynecol 2004; 191: 607-615.
 33. BRAMBATI B, TULUI L.: *Chorionic villus sampling and amniocentesis.* Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17: 197-201.
 34. GUETTA E, GUISTEIN-ABO L, BARKAI G: *Trophoblasts isolated from the maternal circulation: in vitro expansion and potential application in non-invasive prenatal diagnosis.* J Histochem Cytochem 2005; 53: 337-339.
 35. CHRISTENSEN B, KOLVRAA S, LYKKE-HANSEN L, et al.: *Studies on the isolation and identification of fetal nucleated red blood cells in the circulation of pregnant women before and after chorion villus sampling.* Fetal Diagn Ther 2003; 18: 376-384.
 36. DHALLAN R, AU WC, MATTAGAJASINGH S, et al.: *Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation.* JAMA 2004; 291: 1114-1119.
 37. SIVA SC, JOHNSON SL, McCracken SA, et al.: *Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation.* Aust N Z J Obstet Gynaecol 2003; 43: 10-15.
 38. BAHADO-SINGH RO, KLIMÁN H, FENG TY, et al.: *First trimester endocervical irrigation: feasibility of obtaining trophoblast cells for prenatal diagnosis.* Obstet Gynecol 1995; 85: 461-464.
 39. SHERLOCK J, HALDER A, TUTSCHEK B, et al.: *Detection of fetal aneuploidies using transcervical cell samples.* J Med Genetics 1997; 34: 302-305.
 40. HOLZGREVE W, HAHN S.: *Fetal cells in cervical mucus and maternal blood.* Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000; 14: 709-722.
 41. AMIEL A, LIBERMAN M, POMERANZ M, et al.: *"Genetic PAP" at 5-12 gestational weeks: a new screening method for Down syndrome?* J Soc Gynecol Investig 2005; 12: S290. Abstract #644.
 42. VILLAR J, EZCURRA EJ, DE LA FUENTE VG, et al.: *Preterm delivery syndrome: the unmet need.* Res Clin Forums 1994; 16: 9-33.
 43. MARTIN JA, HAMILTON BE, SUTTON PD, et al.: *Births: final data for 2002.* Natl Vital Stat Rep 2003; 52: 1.
 44. ROBERTSON PA, SNIDERMAN SH, LAROS RK Jr, et al.: *Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986.* Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 1629-1641.
 45. NORWITZ ER, ROBINSON JN, CHALLIS JR: *The control of labor.* N Engl J Med 1999; 341: 660-666.
 46. ROMERO R, AVILA C, BREKUS CA, et al.: *The role of systemic and intrauterine infection in preterm parturition.* Ann NY Acad Sci 1991; 662: 355-375.
 47. BUHIMSCHI IA, CRISTNER R, BUHIMSCHI CS.: *Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation.* Br J Obstet Gynecol 2005; 112: 173-181.
 48. WEINER CP, LEE KY, BUHIMSCHI CS, et al.: *Proteomic biomarkers that predict the clinical success of rescue cerclage.* Am J Obstet Gynecol 2005; 192: 710-718.
 49. BUHIMSCHI IA, BUHIMSCHI CS, WEINER CP: *Acute versus chronic inflammation: what makes the intrauterine environment "unfriendly" to the fetus? From free radicals to proteomics.* Am J Reprod Immunol 49: S350.
 50. NORWITZ ER, TSEN LC, PARK JS, et al.: *Discriminatory proteomic biomarker analysis identified free hemoglobin in the cerebrospinal fluid of women with severe preeclampsia.* Am J Obstet Gynecol 2005; in press.
 51. BUHIMSCHI CS, NONWITZ ER, FUNAI E, et al.: *Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia.* Am J Obstet Gynecol 2005; 192: 734-741.