

# **Falsos Positivos e Falsos Negativos dos NIPT (ADN fetal livre) em grávidas do CHUCB**

**Sara Filipa da Cruz Pinheiro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(Mestrado Integrado)

Orientadora: Doutora Nélia Lamberta Pereira Rodrigues  
Co-orientadora: Doutora Fernanda Taliberti Pereto Meyer  
Co-orientador: Professor Doutor Dário Jorge da Conceição Ferreira

**fevereiro de 2025**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Sara Filipa da Cruz Pinheiro, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição 43740 do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 28/02/2025



## **Dedicatória**

Às estrelinhas que iluminam o meu caminho,

Quem me dera ter-vos aqui.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha profunda gratidão à minha orientadora, Doutora Nélia Pereira, e aos meus coorientadores, Doutora Fernanda Meyer e Professor Doutor Dário Ferreira. O vosso apoio, orientação e disponibilidade foram essenciais para a realização deste trabalho. Obrigada por acreditarem em mim e por me guiarem ao longo deste percurso.

Aos amigos que a Covilhã e o curso de Medicina me deram - Alice, Daniel, David, Diogo, Joana, Miguel; às minhas colegas de casa, Alexandra, Ana e Mariana; aos meus afilhados, Inês, João e Paula; e a todos os amigos e pessoas que, de uma forma ou de outra, fizeram parte desta caminhada. Obrigada por cada momento juntos, pelo apoio incondicional e pelas memórias que levarei comigo para sempre. Sem vocês, esta caminhada não teria sido a mesma. Com vocês, não me importaria de viver mais seis anos assim.

Ao meu melhor amigo desde sempre, João, por seres o meu porto seguro e estares sempre comigo, mesmo a mais de 8000 quilómetros de distância.

Ao Eduardo, por seres um pilar nos momentos mais difíceis, por acreditares em mim mesmo quando eu duvido e por teres sido um apoio enorme ao longo desta jornada. Disseste na tua dissertação, há dois anos, que esperavas retribuir-me da mesma forma – hoje posso afirmar que o fizeste, e muitas vezes. Obrigada por tudo.

Ao François e à Maggie, os gatinhos mais fofinhos do planeta, obrigada pelos ronronados terapêuticos e pelas interrupções bem-vindas durante a escrita.

À Covilhã, por me acolheres e te tornares casa, mesmo estando longe da minha.

Aos meus pais, Carlos e Glória, por tudo o que passaram e fizeram para que eu chegasse até onde estou hoje. Graças a vocês, muito em breve serei médica. À minha irmã, Carla, aos meus avós, Ermezília e Jorge, às minhas tias, tios, primo e toda a restante família. Obrigada por tudo – pelo amor, pelo apoio incondicional e por nunca deixarem de acreditar em mim. Gosto muito de vocês.

Mais uma vez, muito obrigada.



## Resumo

**Introdução:** O diagnóstico pré-natal é essencial para a detecção precoce de aneuploidias fetais, como as cromossomopatias mais frequentes (trissomias 21, 18 e 13), permitindo decisões informadas. O rastreio combinado do primeiro trimestre e os testes invasivos, como a BVC e a amniocentese, têm sido amplamente utilizados, mas apresentam limitações e riscos. O teste pré-natal não invasivo, realizado no CHUCB desde 2016, analisa o ADN fetal livre no sangue materno, oferecendo alta sensibilidade e reduzindo a necessidade de testes invasivos. A crescente utilização do NIPT reforça a importância de avaliar a sua precisão e impacto clínico.

**Objetivos:** Este estudo visa avaliar a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos nos NIPT realizados no CHUCB, comparando-os com o cariótipo fetal e o fenótipo/genótipo à nascença. Para além disso, pretende identificar fatores associados a resultados incorretos e propor estratégias para otimizar o aconselhamento genético e a prática clínica no rastreio pré-natal.

**Materiais e métodos:** O estudo é observacional, transversal e retrospectivo, baseado na análise de registos clínicos de grávidas seguidas nas consultas de diagnóstico pré-natal e obstetrícia no Serviço de Obstetrícia do CHUCB entre fevereiro de 2016 e junho de 2024. Foram incluídas 296 gestações e 296 NIPT válidos, após aplicação de critérios de exclusão. Os dados foram recolhidos de forma anónima e incluíram variáveis demográficas, gestacionais, resultados do NIPT e de outros métodos de rastreio e diagnóstico pré-natal. A análise estatística foi realizada com *Microsoft Excel 365* e *IBM SPSS 29.0.1.1*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde e pelo Conselho de Administração do CHUCB, garantindo a confidencialidade dos dados.

**Resultados:** A amostra incluiu 296 gestações com idade materna média de 37 anos. A maioria das conceções foi espontânea (82,1%). Predominaram gestações únicas (96,3%), totalizando 307 fetos, distribuídos equitativamente entre os sexos. O NIPT identificou baixa probabilidade de aneuploidia em 97,6% dos casos, com 7 resultados de alta probabilidade de aneuploidias, dos quais 6 foram confirmados e 1 revelou ser falso positivo. Não foram registados falsos negativos para as aneuploidias rastreadas, porém 2 fetos com aneuploidia não foram identificados pelo NIPT, visto que este apenas rastreava as três aneuploidias mais frequentes, a trissomia 21, trissomia 18 e trissomia 13. Assim, o NIPT apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de

99,65%. A associação entre os resultados do NIPT e a presença de aneuploidia foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

**Conclusão:** O NIPT demonstrou elevado desempenho na detecção de aneuploidias fetais na amostra estudada, com sensibilidade de 100%, especificidade de 99,65% e uma taxa de falsos positivos de apenas 0,3%, sem falsos negativos registrados. Comparado ao RCPT, mostrou-se significativamente superior na redução de falsos positivos. No entanto, reforça-se que o NIPT é um teste de rastreio e não de diagnóstico, sendo essencial confirmar resultados positivos com métodos invasivos. A escolha do painel de rastreio deve ser ajustada ao perfil de risco da gestante, e o aconselhamento genético adequado é fundamental para decisões informadas. Apesar do alto desempenho, a ocorrência de resultados incorretos ainda representa um desafio, destacando a necessidade de um uso criterioso e integrado do NIPT na prática clínica.

## Palavras-chave

Falso positivo; Falso negativo; Teste pré-natal não invasivo; ADN fetal livre; Aneuploidias.



## Abstract

**Introduction:** Prenatal diagnosis is essential for the early detection of fetal aneuploidies, such as the most common chromosomal abnormalities (trisomies 21, 18, and 13), allowing for informed decision-making. First-trimester combined screening and invasive tests, such as CVS and amniocentesis, have been widely used but present limitations and risks. The non-invasive prenatal test (NIPT), implemented at CHUCB since 2016, analyzes free fetal DNA in maternal blood, offering high sensitivity and reducing the need for invasive tests. The growing use of NIPT emphasizes the importance of evaluating its accuracy and clinical impact.

**Objectives:** This study aims to evaluate the occurrence of false positives and false negatives in NIPTs performed at CHUCB, comparing them with fetal karyotype and phenotype/genotype at birth. Furthermore, it seeks to identify factors associated with incorrect results and propose strategies to optimize genetic counseling and clinical practice in prenatal screening.

**Materials and Methods:** The study is observational, cross-sectional, and retrospective, based on the analysis of clinical records of pregnant women followed at the prenatal diagnosis and obstetrics consultations of the CHUCB Obstetrics Service between February 2016 and June 2024. A total of 296 pregnancies and 296 valid NIPTs were included after applying exclusion criteria. Data were collected anonymously and included demographic, gestational variables, NIPT results, and results from other prenatal screening and diagnostic methods. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 365 and IBM SPSS 29.0.1.1. The study was approved by the Health Ethics Committee and the CHUCB Board of Directors, ensuring data confidentiality.

**Results:** The sample included 296 pregnancies with an average maternal age of 37 years. Most conceptions were spontaneous (82.1%). Single pregnancies predominated (96.3%), totaling 307 fetuses, evenly distributed by sex. NIPT identified a low probability of aneuploidy in 97.6% of cases, with 7 high-probability results for aneuploidy, of which 6 were confirmed, and 1 was a false positive. No false negatives were recorded for the screened aneuploidies; however, 2 fetuses with aneuploidy were not identified by NIPT, as it only screened the three most common aneuploidies: trisomy 21, trisomy 18, and trisomy 13. Thus, NIPT showed 100% sensitivity and 99.65% specificity. The association between NIPT results and the presence of aneuploidy was statistically significant ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** NIPT demonstrated high performance in detecting fetal aneuploidies in the studied sample, with 100% sensitivity, 99.65% specificity, and a false positive rate of only 0.3%, with no false negatives recorded. Compared to the RCPT, it was significantly superior in reducing false positives. However, it is emphasized that NIPT is a screening test and not a diagnostic test, and positive results must be confirmed with invasive methods. The choice of the screening panel should be adjusted to the pregnant woman's risk profile, and appropriate genetic counseling is crucial for informed decision-making. Despite its high performance, the occurrence of incorrect results still represents a challenge, highlighting the need for careful and integrated use of NIPT in clinical practice.

## **Keywords**

False positive; False negative; Non-invasive prenatal testing; Cell-free fetal DNA; Aneuploidies.



# Índice

1	Introdução	1
1.1	Aneuploidias fetais	1
1.2	Diagnóstico pré-natal	2
1.3	Teste pré-natal não invasivo (NIPT)	4
1.4	Objetivos do estudo	7
2	Materiais e Métodos	9
2.1	Tipo de Estudo	9
2.2	População em Estudo	9
2.3	Recolha de Dados	10
2.4	Descrição das Variáveis	11
2.5	Análise Estatística	14
2.6	Considerações Éticas	14
3	Resultados	16
3.1	Caracterização da amostra	16
3.1.1	Idade Materna	16
3.1.2	Tipo de concepção	17
3.1.3	Número de fetos por gestação e Género do feto	17
3.1.4	Idade Gestacional	18
3.2	Testes de rastreio e diagnóstico pré-natal	18
3.2.1	Ecografia do primeiro trimestre	18
3.2.2	Amniocentese	19
3.2.3	Rastreio Combinado do primeiro trimestre	19
3.3	Resultados dos testes NIPT	20
3.3.1	Tipos de teste utilizados	21
3.3.2	Fração fetal obtida	22
3.3.3	Desempenho do NIPT	23
3.3.4	Associação entre os resultados dos NIPT e a presença ou ausência de aneuploidias nos fetos	23
3.3.5	Análise da proporção de FP em relação a um limiar de 1%	24
3.3.6	Resultados inconclusivos	24
3.3.7	Falso positivo	24
3.3.8	Realização de teste confirmatório/ diagnóstico após NIPT com resultado de risco elevado de aneuploidia	25

3.4 Cariótipo e fenótipo fetal	25
3.5 Desfechos gestacionais	26
3.5.1 Desfecho dos fetos com aneuploidia	26
3.5.2 IMG de feto euploide	27
4 Discussão	29
4.1 Limitações do estudo	37
5 Conclusão	39
6 Referências bibliográficas	41
7 Anexos	45
7.1 Anexo I - Parecer da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira	45
7.2 Anexo II - Autorização do Conselho de Administração do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira	46



## Lista de Figuras

Figura 1 – Processo de seleção da amostra.....	10
Figura 2 – Gráfico de barras da distribuição de idades das gestantes da amostra.....	16
Figura 3 – Gráfico circular com a distribuição dos tipos de concepção da amostra.....	17
Figura 4 – Gráfico circular com a distribuição das gestações únicas e gemelares da amostra.....	17
Figura 5 – Gráfico de barras com a distribuição da idade gestacional no momento da realização do NIPT.....	18
Figura 6 – Gráfico circular com a distribuição dos resultados da ecografia do primeiro trimestre.....	18
Figura 7 – Gráfico circular com a distribuição dos resultados da amniocentese.....	19
Figura 8 – Gráfico circular com a distribuição dos resultados do rastreio combinado do primeiro trimestre.....	19
Figura 9 – Resultados dos testes pré-natais não invasivos.....	21
Figura 10 – Gráfico de barras com a distribuição da Fração Fetal dos NIPT da amostra.....	22



## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição dos resultados do teste pré-natal não invasivo (NIPT).....	11
Tabela 2 – Distribuição dos desfechos gestacionais da amostra.....	11
Tabela 3 – Cariótipo e fenótipo/genótipo dos fetos da amostra.....	11
Tabela 4 – Estatísticas descritivas das variáveis numéricas.....	12
Tabela 5 – Distribuição do género dos fetos da amostra.....	12
Tabela 6 – Método de conceção das gestações da amostra.....	12
Tabela 7 – Distribuição das gestações únicas e gemelares e corionicidade da amostra..	12
Tabela 8 – Distribuição dos resultados da ecografia do primeiro trimestre.....	13
Tabela 9 – Distribuição dos resultados do RCPT.....	13
Tabela 10 – Distribuição dos resultados da amniocentese.....	13
Tabela 11 – Parâmetros de desempenho do RCPT.....	20
Tabela 12 – Parâmetros de desempenho do NIPT.....	23
Tabela 13 – Comparação das métricas de desempenho do NIPT e RCPT.....	32



## Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
$\beta$ -HCG	Fração beta da hormona gonadotrofina coriónica humana
BVC	Biopsia das vilosidades coriónicas
CffDNA	<i>Cell free fetal DNA</i> / ADN fetal livre
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
DPN	Diagnóstico Pré-Natal
EUROCAT	Vigilância Europeia de Anomalias Congénitas
FF	Fração Fetal
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
IG	Idade Gestacional
IMC	Índice de Massa Corporal
IMG	Interrupção médica da gravidez
IVG	Interrupção voluntária da gravidez
LR	<i>Likelihood Ratio</i>
NIPT	<i>Non-Invasive Prenatal Testing</i> / Teste Pré-natal Não Invasivo
PAPP-A	Proteína A plasmática associada à gravidez
QF-PCR	<i>Quantitative fluorescent Polymerase Chain Reaction</i>
RCPT	Rastreio Combinado do Primeiro Trimestre
RENAC	Registo Nacional de Anomalias Congénitas
SMFM	<i>Society for Maternal-Fetal Medicine</i>
T13	Trissomia 13/ Síndrome de Patau
T18	Trissomia 18/ Síndrome de Edwards
T21	Trissomia 21/ Síndrome de Down
ULS	Unidade Local de Saúde
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo



# 1. Introdução

## 1.1 Aneuploidias fetais

As aneuploidias fetais caracterizam-se pela presença de um número anormal, quer por défice, quer por excesso, de cromossomas no feto e estão entre as causas mais comuns de abortos espontâneos, mortalidade perinatal e perturbações do neurodesenvolvimento (1). As aneuploidias mais comuns são as trissomias dos cromossomas 21 (Síndrome de Down), 18 (Síndrome de Edwards) e 13 (Síndrome de Patau), onde há uma cópia extra do cromossoma 21, 18 e 13, respetivamente (2).

Dados da Vigilância Europeia de Anomalias Congénitas (EUROCAT), estimam que, em Portugal, a prevalência das síndromes anteriormente descritas foi de aproximadamente 13,5 casos/10.000 nascimentos, entre 2005 e 2022 (3). Para além disso, segundo o Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC) mais recente, referente a 2018-2019, a prevalência de nascimentos com anomalias cromossómicas em Portugal foi de 34,10 casos/10.000 nascimentos, tendo a Síndrome de Down a maior prevalência com 19,52 casos/10.000 nascimentos, seguido da Síndrome de Edwards e Síndrome de Patau, que em conjunto resultaram em 6,77 casos/10.000 nascimentos (4).

Entre 2018 e 2019, 93,4% das anomalias cromossómicas no nosso país foram identificadas ainda no período pré-natal, sendo que 100% das trissomias 13 e 18 foram diagnosticadas neste período, assim como 91,2% das trissomias 21 (4). Para além disso, o número de crianças nascidas com T21 têm vindo a diminuir, devido ao grande aumento das interrupções voluntárias da gravidez, presumivelmente pelo aumento da acessibilidade aos diagnósticos pré-natais de aneuploidias (5), notando-se, assim, a importância do rastreio e diagnóstico pré-natal para a identificação e gestão precoce destas situações.

Em termos de distribuição geográfica por residência da gestante durante a gravidez, concelhos da Beira Interior, nomeadamente Penamacor, Sabugal, Guarda, Celorico da Beira e Pinhel tiveram uma prevalência superior a 300 casos com anomalias congénitas/ 10 000 nascimentos; e concelhos que fazem fronteira com a Covilhã, nomeadamente Seia e Belmonte, apresentaram uma prevalência de 200-299,9 casos/10.000 nascimentos, o que demonstra a importância deste estudo no Centro

Hospitalar Universitário Cova da Beira<sup>1</sup>, que recebe grávidas residentes nas localizações anteriormente referidas (4).

Para além disso, o adiamento da maternidade observado nas últimas décadas está associado a um aumento das intervenções de diagnóstico pré-natal e ao aumento da morbidade materna e perinatal (6). A título de exemplo, a T21 tem uma prevalência aproximadamente de 1/1300 em gestantes com 25 anos, de 1/380 em gestantes com 35 anos e de 1/28 em gestantes com 45 anos, o que demonstra o grande incremento da sua incidência com o aumento da idade materna (7). Assim, é evidenciada a relevância do estudo dos testes de rastreio e diagnóstico pré-natal que são realizados nas consultas de obstetria, bem como a necessidade de entender a sua eficácia. É de salientar, no entanto, que embora o risco de trissomias 21, 18 e 13 seja aumentado com o aumento da idade materna, isso não representa um fator de risco para outras aneuploidias como as dos cromossomas sexuais ou triploidias (1).

As aneuploidias fetais afetam não apenas a saúde do feto, como também o bem-estar psicológico e emocional das famílias envolvidas. Desta forma, a identificação precoce dessas anomalias permite aos profissionais de saúde e progenitores um maior período de tempo para reflexão e tomada de decisões informadas. Neste sentido, o diagnóstico pré-natal tornou-se uma ferramenta essencial na prática obstétrica, oferecendo métodos de rastreio e diagnóstico que variam em precisão, segurança e risco.

## 1.2 Diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal começou a desenvolver-se em Portugal desde 1984, ano em que foi publicada a primeira legislação que autorizou a interrupção voluntária da gravidez por causas genéticas (8) e define-se como o conjunto de procedimentos realizados com o intuito de determinar se um feto é portador ou não de uma anomalia congénita (9).

No Sistema Nacional de Saúde Português, é disponibilizado às grávidas, entre a 11<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> semana + 6 dias de gestação, o rastreio combinado do primeiro trimestre. Este rastreio faz um cálculo de risco combinado com base na idade materna, marcadores ecográficos (medição da translucência da nuca) e na determinação sanguínea materna de duas substâncias fetoplacentárias: a proteína A plasmática associada à gravidez (PAPP-A) e a fração beta da hormona gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -HCG). Este

---

<sup>1</sup> Este estudo foi realizado no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, que, a partir de 2024, passou a integrar a Unidade Local de Saúde da Cova da Beira (ULS Cova da Beira), na sequência da reorganização do Serviço Nacional de Saúde.

rastreio pode alcançar uma taxa de deteção de até 95% para T21, com uma taxa de falsos positivos de 5%. A inclusão de marcadores ecográficos adicionais, como osso nasal hipoplásico ou ausente, regurgitação da válvula tricúspide e/ou uma onda negativa do ducto venoso, melhora o desempenho deste rastreio e reduz a taxa de falsos positivos para 2,5-3,5%. No caso das T18 e T13, a taxa de deteção pode atingir 97% e 92%, respetivamente. (5) Os resultados do RCPT definem os pacientes em três grupos de risco: alto risco para trissomia ( $\geq 1:100$ ), risco moderado ( $1:101-1:1000$ ) e baixo risco ( $< 1:1000$ ) (10).

Até março de 2024, as gestantes que cumpriam certos requisitos clínicos, presentes no Despacho nº 5411/97 publicado no Diário da República, nomeadamente “idade superior a 35 anos, filho anterior portador de cromossomopatia, progenitor portador de cromossomopatia equilibrada, suspeita ecográfica de anomalia congénita fetal, alteração dos valores dos marcadores serológicos maternos, risco elevado de recorrência de doença genética não cromossómica e risco elevado de efeito teratogénico” (9), deveriam ser encaminhadas para os cuidados de saúde secundários para realizar consulta de diagnóstico pré-natal (5). No entanto, a partir de março de 2024, a estratégia nacional foi alterada, conforme os critérios estabelecidos na Norma de Orientação Clínica da Direção-Geral da Saúde nessa altura publicada. Assim, atualmente, os critérios de encaminhamento para consulta de diagnóstico pré-natal são: presença de um resultado de rastreio combinado com risco aumentado (risco calculado superior ou igual a  $1:100$ ) ou de um risco intermédio de aneuploidias (risco calculado entre  $1:101$  e  $1:1000$ ). No caso de risco intermédio, deve ser proposta a realização de teste genético de análise do ADN fetal circulante no sangue materno. (11)

Atualmente, existem vários testes invasivos disponíveis para detetar anomalias fetais em gestações de alto risco de anomalias congénitas, nomeadamente a amniocentese, a biópsia das vilosidades coriônicas (BVC) e a cordocentese. No entanto, estes exames, por serem invasivos, acarretam riscos para a gestante e para o feto. No caso da amniocentese, embora as complicações sejam pouco frequentes, existe o risco de perda de líquido amniótico, corioamnionite e de aborto espontâneo. Para além disso, uma desvantagem importante da amniocentese realizada no segundo trimestre é o facto dos resultados estarem disponíveis tardiamente na gravidez, geralmente após as 16 semanas de gestação. Alternativamente, a BVC pode ser realizada mais precocemente, no primeiro trimestre, permitindo uma obtenção mais rápida dos resultados (12). No entanto, a taxa de aborto espontâneo associada à BVC é semelhante à da amniocentese e existe ainda o risco de sangramento vaginal que ocorre em até 32% das grávidas submetidas a este procedimento. Em adição a isto, ainda que seja controverso, há

relatos de que a BVC realizada antes das 10 semanas está associada à redução de membros do feto e a defeitos oromandibulares (13). Importa ainda referir que a amniocentese realizada precocemente, antes do segundo trimestre, não demonstrou ser tão segura como a amniocentese convencional, estando associada a um risco aumentado de perda gestacional e aborto espontâneo. Adicionalmente, alguns estudos apontam para uma maior incidência de anomalias fetais, nomeadamente malformações dos pés, como o pé torto congénito (*talipes equinovarus*)(12). Embora o risco de aborto relacionado a estes procedimentos seja inferior a 1%, ele continua a ser significativo e potencialmente evitável (1). Estima-se que a perda fetal diretamente atribuível ao procedimento invasivo seja de 0,1% para a amniocentese e 0,2% para a BVC (14).

### **1.3 Teste pré-natal não invasivo (NIPT)**

Contrariamente às técnicas referidas anteriormente, o NIPT necessita apenas de uma pequena amostra de sangue materno para a sua realização, sendo assim um teste de rastreio pré-natal não invasivo, com riscos mínimos para a gestante e para o feto. Desta forma, este teste tem contribuído para a diminuição dos riscos que ocorrem como resultado da realização dos testes invasivos (1)(15).

O NIPT foi desenvolvido por Yuk-Ming Dennis Lo após ter descoberto o ADN fetal livre (CffDNA) no sangue materno, em 1997 (16). Inicialmente, o CffDNA era utilizado para determinar o sexo do feto. Porém, com o desenvolvimento de tecnologias avançadas de sequenciação de ADN, conhecidas como sequenciação de nova geração, o CffDNA começou a ser utilizado para o rastreio de aneuploidias autossómicas comuns em fetos (17). O NIPT foi introduzido na prática clínica pela primeira vez em 2011 (16), tendo passado a ser utilizado pelo Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira anos mais tarde, em 2016.

Este teste deteta e analisa o ADN fetal livre presente numa amostra de sangue periférico materno. O ADN livre circulante no plasma materno inclui ADN tanto de origem materna como de origem fetal. O ADN livre circulante materno provém de todos os órgãos da gestante, incluindo tumores sólidos, e do sistema hematopoiético (17). Por outro lado, o CffDNA é originado na placenta, normalmente secundário à apoptose dos trofoblastos, podendo ser detetado a partir das 5 semanas de gestação, e é removido totalmente do plasma materno horas após o parto, o que o torna também adequado para testes de gravidez (1)(15).

A fração fetal (FF), que consiste no rácio entre o CffDNA e a totalidade do ADN presente no plasma materno, é variável e aumenta com a progressão da gestação. A confiabilidade de um NIPT está fortemente ligado com a FF, uma vez que é menos difícil diferenciar o ADN materno do CffDNA quando a FF está mais elevada (1)(15). Assim, a taxa de deteção de T21 passa de 62,1% para 100%, quando a FF é 4% e quando se apresenta acima de 9%, respetivamente. Por esse motivo, muitas empresas optam por considerar o teste como inválido quando a FF é inferior a 4%, devido à falta de fiabilidade nessas condições (1). Como a FF está positivamente correlacionada com a idade gestacional, o NIPT deve ser realizado a partir das 9-10 semanas de gestação (17). Outros fatores que podem resultar num NIPT inconclusivo incluem erros efetuados durante a recolha de sangue ou durante o transporte das amostras e falhas laboratoriais (1), bem como em gestantes obesas, visto que a obesidade materna está associada a uma baixa FF por aumento do ADN livre materno (18), e em casos de dissomia uniparental ou consanguinidade parental (5).

Existem outros fatores que influenciam a FF e, conseqüentemente, a eficácia do teste. A FF diminui com o aumento da idade materna e é inferior em gestantes com ascendência afro-caribenha e sul-asiática (provenientes da Índia e Paquistão), mulheres com um índice de pulsatilidade elevado nas artérias uterinas na ecografia de primeiro trimestre, em gestações por fertilização *in vitro* (FIV) e em gravidezes gemelares (principalmente em gémeos bicoriónicos quando comparados a gémeos monocoriónicos) - e, como consequência, a taxa de erro é cerca de 3-4 vezes superior em gestações de gémeos, quando comparado a gestações únicas. Para além disso, o NIPT é também mais complexo em gravidezes gemelares, porque, se forem dizigóticas, pode haver a possibilidade de apenas um gémeo ter anomalias cromossómicas. Adicionalmente, a contribuição para a FF pode ser diferente entre os gémeos, e por isso foi proposto considerar a FF mais baixa entre os dois fetos, ao invés da FF total. A maior taxa de falha nestes casos também pode ser explicada pela maior incidência de FIV entre as gravidezes gemelares.

Por outro lado, a FF é superior nas raças do Leste Asiático (China e Japão) e em gestantes fumadoras, por diminuição do ADN livre materno.

A FF parece ser também influenciada pelo comprimento crânio-caudal do feto, sexo fetal, cariótipo fetal, níveis de PAPP-A e de  $\beta$ -HCG livre, bem como distúrbios relacionados com a placenta e resultados perinatais adversos (17)(1). Assim, quando a FF está abaixo do 10º percentil, está associada a um aumento do risco de pré-eclâmpsia ou parto prematuro e, quando está abaixo do 5º percentil, está associada a um feto com baixo peso à nascença. Uma FF diminuída também é associada a fetos com trissomia 18, trissomia 13 e triploidias, uma vez que essas condições estão relacionadas a níveis

baixos de PAPP-A, refletindo uma menor massa placentária e, por consequência, uma fonte reduzida de CffDNA. Assim, é de notar que mulheres com testes inconclusivos têm um risco superior para aneuploidia, nomeadamente de T13, T18 e triploidia, e, portanto, precisam de aconselhamento cuidadoso sobre eventuais testes adicionais, incluindo testes diagnósticos como a BVC e amniocentese (19). Por outro lado, quando a FF excede o 95º percentil, também tem sido relacionada a complicações na gravidez, como o nascimento de bebés pequenos para a idade gestacional. Para além disso, constatou-se que a FF na trissomia 21 é, por vezes, superior à observada em casos euploides (1).

Devido a estes fatores que podem influenciar a FF, os médicos devem obter o máximo de informação possível sobre as características da mulher grávida e do feto ao considerar a realização de um NIPT, sendo indispensável a realização de uma ecografia de boa qualidade prévia à realização do exame. Assim, é vantajoso fazer uma avaliação abrangente, para garantir uma FF adequada e, conseqüentemente, um rastreio com NIPT preciso para aneuploidias (17)(5).

Embora uma vantagem do NIPT para a deteção de trissomias autossómicas comuns seja a sua alta sensibilidade e especificidade com alto valor preditivo negativo, o que se traduz numa redução da realização de testes invasivos (20), estudos indicam que gestantes que realizam o NIPT frequentemente têm pouco conhecimento sobre as possíveis limitações deste teste, nomeadamente o facto de um NIPT negativo não garantir um bebé saudável ou eliminar a possibilidade deste ser portador de Síndrome de Down. Assim, é de extrema importância que as grávidas sejam informadas sobre as potenciais limitações deste teste, como o risco de resultados falsos positivos e falsos negativos e do feto poder ser portador de condições genéticas que o NIPT não consegue detetar. (21)

Resultados falsos positivos e falsos negativos podem ocorrer no NIPT, embora em números significativamente inferiores do que os verificados no RCPT. Os FP podem ser causados por mosaïcismo confinado à placenta, onde algumas células apresentam anomalias, embora o feto não seja afetado, representando uma das principais razões para resultados discordantes entre o NIPT e testes invasivos; presença de gémeo evanescente/ não evolutivo, motivo pelo qual pode existir discordância no sexo fetal ou no estado de Rhesus-D; ou anomalias genéticas previamente não identificadas na grávida. Outros motivos incluem neoplasia materna, mosaïcismo fetal e variantes patogénicas no número de cópias (1)(5)(22). Embora menos frequentes do que FP, podem ocorrer também FN (1)(22).

Assim, atualmente, ao contrário de testes invasivos como a BVC e a amniocentese, o NIPT ainda não é considerado um teste de diagnóstico pré-natal definitivo, devido à presença de, embora pouco frequentes, resultados falsos positivos e falsos negativos (23). Assim, um resultado positivo num NIPT requer um teste invasivo para confirmação (22).

Os resultados falsos positivos e falsos negativos podem ter um impacto psicológico e clínico significativo. A falta de comunicação clara sobre a probabilidade de um falso positivo pode levar a uma grande sobrecarga emocional e à interrupção de uma gravidez de um feto saudável. Para além disso, um FP pode levar a gestante a procurar testes de diagnóstico invasivos desnecessários (22). Um FN, por sua vez, pode resultar na falta de preparação para cuidar de uma criança que possui uma condição genética que não foi previamente diagnosticada.

## 1.4 Objetivos do Estudo

O melhor entendimento dos resultados falsos positivos e falsos negativos dos testes pré-natais não invasivos possibilita aprimorar a prática clínica e assegurar que o aconselhamento dado às gestantes seja mais eficaz e fundamentado em evidências.

Deste modo, os objetivos deste estudo são:

- Comparar os resultados dos NIPT com outros métodos de rastreio e diagnóstico pré-natal (como RCPT e amniocentese, quando esta é realizada);
- Avaliar os resultados incorretos (falsos positivos e falsos negativos)<sup>2</sup> dos NIPT realizados às grávidas seguidas nas consultas de DPN e obstetrícia do serviço de Obstetrícia do CHUCB, comparando os resultados dos NIPT com o cariótipo do feto e fenótipo/genótipo à nascença, quando o cariótipo não foi estudado;
- Identificar padrões que influenciam a ocorrência de resultados errados;
- Propor possíveis melhorias para a prática clínica, com o objetivo de incrementar a qualidade do aconselhamento genético e das decisões clínicas relacionadas à gravidez.

---

<sup>2</sup> Um resultado é considerado Falso Positivo quando o NIPT indica a presença de uma anormalidade que, na realidade, não existe; Inversamente, um resultado é classificado como Falso Negativo quando o NIPT não identifica uma anormalidade quando esta existe.



## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Tipo de Estudo**

O presente estudo tem carácter observacional, transversal e retrospectivo. Este tipo de investigação envolve a recolha e análise de dados já existentes, obtidos através de processos clínicos de grávidas seguidas nas consultas de DPN e obstetrícia do Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira.

### **2.2 População em Estudo**

A população em estudo é constituída por mulheres grávidas seguidas em consultas de DPN e obstetrícia no Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira que realizaram testes pré-natais não invasivos entre fevereiro de 2016 e junho de 2024. Durante este período, foram efetuados 327 NIPT. Foram incluídas no estudo as grávidas acompanhadas no serviço de obstetrícia do CHUCB que realizaram o NIPT e cujos resultados foram registados, independentemente do desfecho gestacional. Foram excluídas as grávidas que não consentiram realizar o NIPT, as que não o realizaram embora o teste tenha sido prescrito, as que não foram acompanhadas no CHUCB durante a gestação, e aquelas cujos resultados do NIPT ou desfechos gestacionais não estavam disponíveis nos registos clínicos eletrónicos. Para além disso, foram excluídos os NIPT com resultados inconclusivos.

Importa referir que, em 2024, o Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira passou a integrar a Unidade Local de Saúde da Cova da Beira (ULS Cova da Beira), mas, para efeitos deste trabalho, será mantida a referência à designação anterior, uma vez que a maioria dos dados analisados correspondem a um período anterior à transição e, para além disso, esta investigação começou a ser conduzida antes da integração do hospital na ULS.

A obtenção da amostra foi realizada através de um pedido ao Gabinete de Estudos, Planeamento e Informação para a Gestão do CHUCB e ao laboratório do CHUCB, resultando numa listagem inicial de 324 gestantes, correspondendo a um total de 327 NIPT, dado que três grávidas obtiveram resultados inconclusivos e necessitaram de repetir o teste. Destas, duas obtiveram um resultado conclusivo no segundo teste, enquanto uma permaneceu com resultado inconclusivo.

Após a aplicação dos critérios de exclusão supracitados, foram eliminadas 28 gestações e 31 NIPT, resultando numa amostra final de 296 gestações incluídas no presente estudo e um total de 296 NIPT válidos.

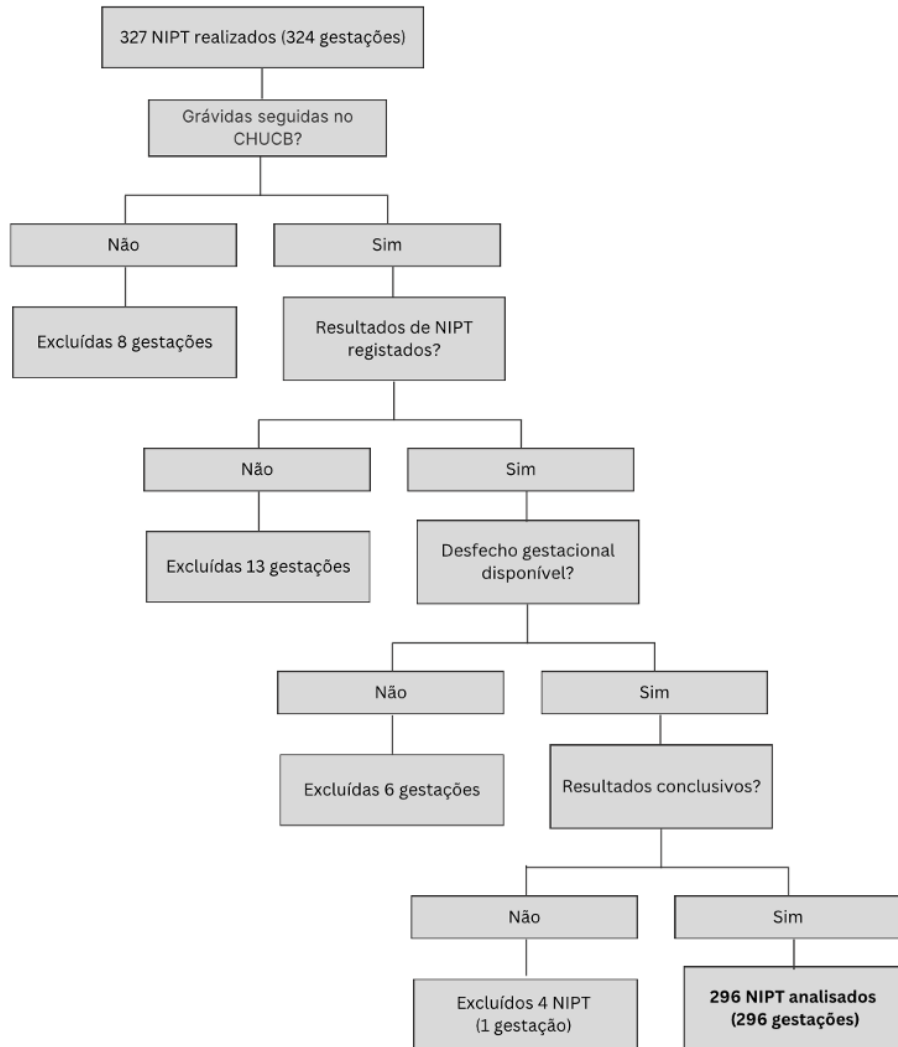


Figura 1: Processo de seleção da amostra

### 2.3 Recolha de Dados

A recolha de dados foi realizada através da análise dos registos clínicos eletrónicos das gestantes seguidas nas consultas de DPN e obstetria do Serviço de Obstetria do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira. Os dados foram extraídos de forma anónima e incluíram informações sobre características demográficas e gestacionais, resultados dos NIPT e de outros testes de rastreio e diagnóstico pré-natal e desfechos gestacionais.

## 2.4 Descrição das Variáveis

No presente estudo, foram analisadas variáveis dependentes e independentes, de acordo com o seu impacto nos resultados obtidos.

As variáveis dependentes incluem o resultado do NIPT (tabela 1), o desfecho gestacional, que abrange a ocorrência de nado-vivo, interrupção médica da gravidez (IMG) ou óbito fetal (tabela 2), e ainda o resultado do cariótipo fetal ou do fenótipo/genótipo à nascença, que confirma ou exclui a presença de alterações cromossômicas identificadas previamente nos testes de rastreio (tabela 3).

Tabela 1: Distribuição dos resultados do teste pré-natal não invasivo (NIPT).

Resultado	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Risco baixo	289	97,7
Alta probabilidade de trissomia 21	4	1,4
Alta probabilidade de trissomia XXY	2	0,7
Alta probabilidade de trissomia 13	1	0,3
Total	296	100,0

Tabela 2: Distribuição dos desfechos gestacionais da amostra.

Desfecho gestacional	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Nado-vivo	300	97,7
Interrupção médica da gravidez	6	2,0
Óbito fetal	1	0,3
Total	307	100,0

Tabela 3: Cariótipo e fenótipo/genótipo dos fetos da amostra.

Cariótipo/fenótipo	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Feto euploide	299	97,4
Feto com aneuploidia	8	2,6
Total	307	100,0

Por outro lado, as variáveis independentes correspondem a fatores que podem influenciar os resultados obtidos nos testes e a evolução da gestação. Entre estas, incluem-se características maternas, como a idade materna, a idade gestacional no momento da realização do NIPT, bem como fatores relacionados com o próprio teste, nomeadamente a tecnologia de NIPT utilizada e a fração fetal obtida (tabela 4).

## Falsos Positivos e Negativos dos NIPT (ADN fetal livre) em grávidas do CHUCB

Tabela 4: Estatísticas descritivas das variáveis numéricas.

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Idade materna (anos)	24	46	37	3,20
Idade gestacional (dias)	74	162	109	12,25
Fração Fetal (%)	3	28	10,4	3,92

Para além disso, são também consideradas variáveis independentes o género do feto (tabela 5), o método de conceção, distinguindo-se entre gravidez espontânea e recurso a métodos de procriação medicamente assistida (tabela 6), e o número de fetos por gestação, diferenciando-se entre gravidez única ou múltipla, bem como a corionicidade nos casos gemelares (tabela 7).

Tabela 5: Distribuição do género dos fetos da amostra.

Género do feto	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Feminino	151	49,0
Masculino	156	51,0
Total	307	100,0

Tabela 6: Método de conceção das gestações da amostra.

Método de conceção	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Gravidez espontânea	243	82,1
Recurso a métodos de procriação medicamente assistida	53	17,9
Total	296	100,0

Tabela 7: Distribuição das gestações únicas e gemelares e corionicidade da amostra.

Tipo de gestação	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Gestação única	284	95,9
Gestação gemelar (bicoriónica e biamniótica)	9	3,1
Gestação gemelar (monocoriónica e biamniótica)	2	0,7
Gestação com gémeo evanescente	1	0,3
Total	296	100,0

## Falsos Positivos e Negativos dos NIPT (ADN fetal livre) em grávidas do CHUCB

Adicionalmente, incluem-se ainda como variáveis independentes os resultados de outros métodos de rastreio pré-natal, como os achados na ecografia do primeiro trimestre (tabela 8) e o resultado do rastreio combinado do primeiro trimestre (tabela 9), bem como o resultado da amniocentese (tabela 10), sempre que esta tenha sido realizada.

Tabela 8: Distribuição dos resultados da ecografia do primeiro trimestre.

<b>Resultado</b>	<b>Frequência absoluta (n)</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Não realizou	7	2,4
Realizou com resultado normal	265	89,5
Realizou com achados anormais	24	8,1
Total	296	100,0

Tabela 9: Distribuição dos resultados do RCPT.

<b>Resultado</b>	<b>Frequência absoluta (n)</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Risco reduzido	213	72,0
Não fez rastreio	35	11,8
Risco elevado para T21	14	4,7
Risco moderado para T21	33	11,2
Risco elevado para T13	1	0,3
Total	296	100,0

Tabela 10: Distribuição dos resultados da amniocentese.

<b>Resultado</b>	<b>Frequência absoluta (n)</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Não realizou	281	94,9
Realizou com resultado de feto euploide	9	3,0
Realizou com resultado de trissomia 21	4	1,4
Realizou com resultado de trissomia XXY	1	0,3
Realizou com resultado de triploidia 69, XXX	1	0,3
Total	296	100,0

## **2.5 Análise Estatística**

O tratamento dos dados e a análise estatística foram realizadas com recurso ao *Microsoft Excel 365* e ao *IBM SPSS 29.0.1.1*.

## **2.6 Considerações Éticas**

Todos os dados foram recolhidos de forma anónima, respeitando o direito à privacidade das utentes e a base de dados foi destruída após a conclusão deste estudo. O sigilo e confidencialidade foram sempre assegurados. A aprovação ética foi solicitada e aprovada pela Comissão de Ética para a Saúde. Para além disso, foi também obtida autorização do Conselho de Administração do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (Anexo I e II).



### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização da amostra

##### 3.1.1 Idade Materna

A presente amostra contempla 296 gestações. A idade materna no momento da realização do NIPT variou entre os 24 e os 46 anos de idade, com uma média de idades de 37 anos e um desvio-padrão de 3,20. A maioria das gestantes, 243 (82,1%), tinham uma idade igual ou superior a 35 anos, enquanto 53 (17,9%) apresentavam uma idade inferior a 35 anos.

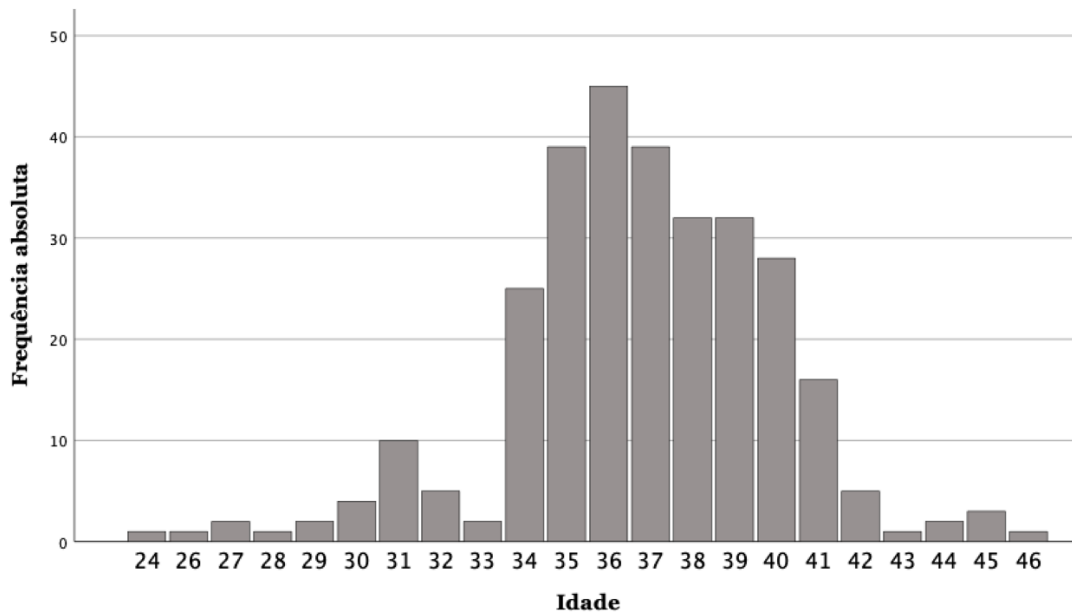


Figura 2: Gráfico de barras da distribuição de idades das gestantes da amostra.

### 3.1.2 Tipo de concepção

Das 296 gestações que integram a amostra, 53 (17,9%) resultaram de métodos de procriação medicamente assistida, enquanto 243 (82,1%) ocorreram de forma espontânea.

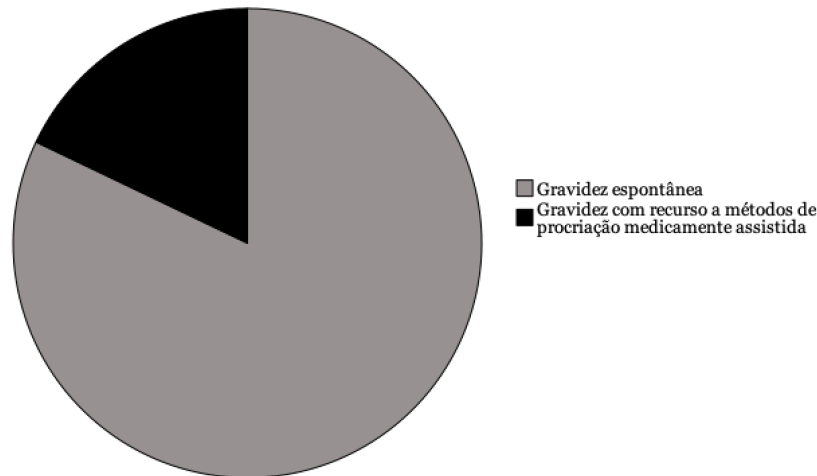


Figura 3: Gráfico circular com a distribuição dos tipos de concepção da amostra.

### 3.1.3 Número de fetos por gestação e Género do feto

No que se refere ao número de fetos por gestação, 284 (95,9%) corresponderam a gestações únicas. Para além disso, 12 gestações (4,1%) foram gemelares - das quais 9 eram biamnióticas e bicoriónicas, 2 eram monocoriónicas e biamnióticas e 1 era gestação com gémeo evanescente. Assim, há um total de 307 fetos analisados. Em relação ao género destes, 151 (49%) eram do sexo feminino e 156 (51%) do sexo masculino.

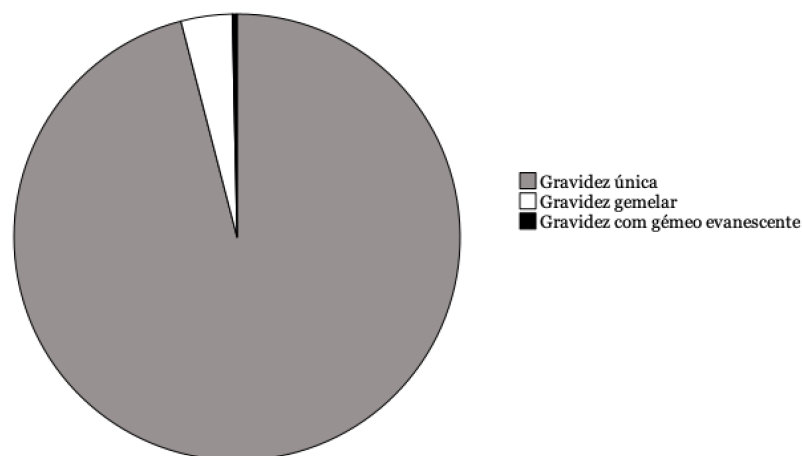


Figura 4: Gráfico circular com a distribuição das gestações únicas e gemelares da amostra.

### 3.1.4 Idade Gestacional

A idade gestacional no momento da realização do NIPT variou entre os 74 dias (10 semanas + 2 dias) e os 162 dias (23 semanas + 1 dia), com uma média de 109 dias (15 semanas + 4 dias) e um desvio-padrão de 12,25.

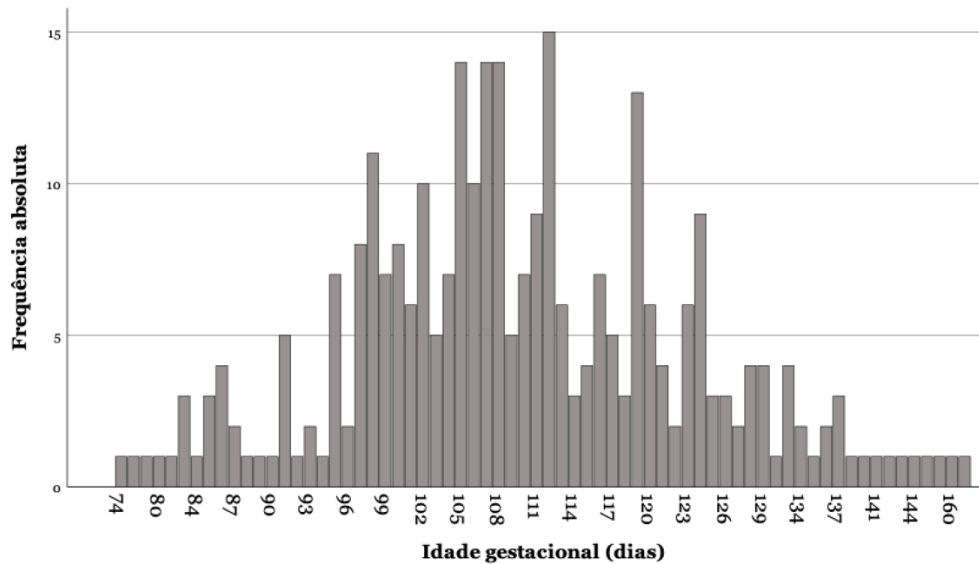


Figura 5: Gráfico de barras com a distribuição da idade gestacional no momento da realização do NIPT.

## 3.2 Testes de rastreio e diagnóstico pré-natal

### 3.2.1 Ecografia do primeiro trimestre

Em relação à ecografia do primeiro trimestre, 265 gestantes (89,5%) apresentaram um resultado normal, enquanto 24 (8,1%) tiveram achados anormais. Importa ainda referir que 7 gestantes (2,4%) não realizaram ecografia no primeiro trimestre.

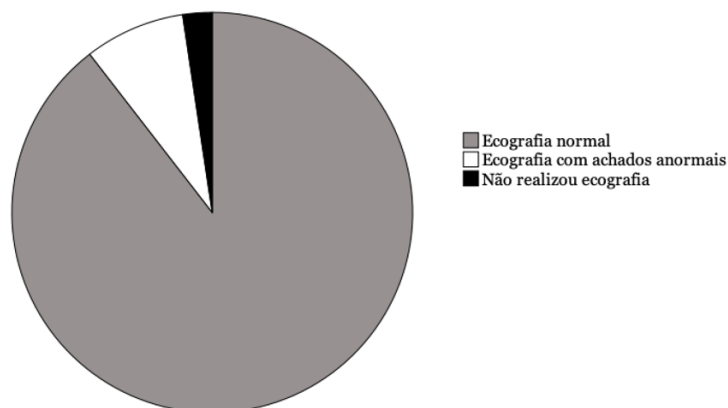


Figura 6: Gráfico circular com a distribuição dos resultados da ecografia do primeiro trimestre.

### 3.2.2 Amniocentese

No que diz respeito à amniocentese, 281 grávidas (94,9%) optaram por não realizar o exame, enquanto 15 (5,1%) decidiram submeter-se a este teste de diagnóstico. Entre as gestantes que realizaram amniocentese, 9 (3%) obtiveram um resultado normal (feto euploide), 4 (1,4%) obtiveram o resultado de feto com trissomia 21, 1 (0,3%) obteve o resultado de trissomia XXY e 1 (0,3%) obteve o resultado de triploidia 69, XXX.

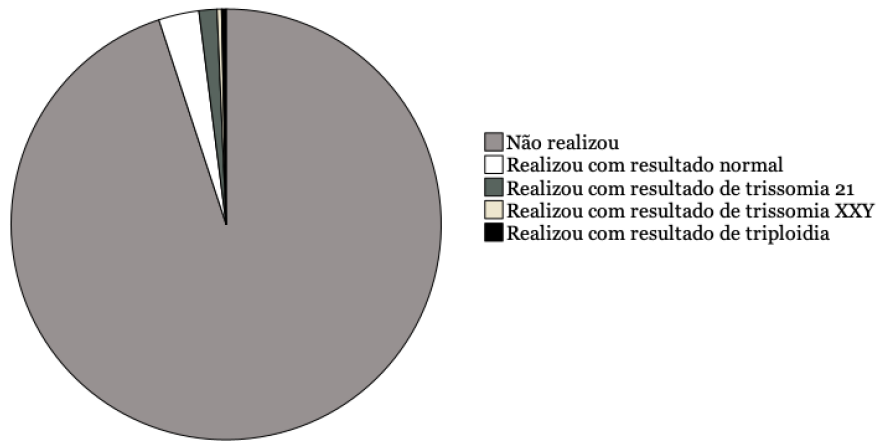


Figura 7: Gráfico circular com a distribuição dos resultados da amniocentese.

### 3.2.3 Rastreo Combinado do primeiro trimestre

Relativamente ao rastreo combinado do primeiro trimestre, 213 gestantes (72%) apresentaram um resultado de risco reduzido para trissomias, enquanto 14 (4,7%) tiveram um resultado de risco elevado para T21 e 33 (11,2%) apresentaram risco moderado para a mesma condição. Para além disso, 1 grávida (0,3%) obteve resultado de risco elevado para trissomia 13 e 18. Importa referir ainda que 35 gestantes (11,8%) não realizaram o rastreo.

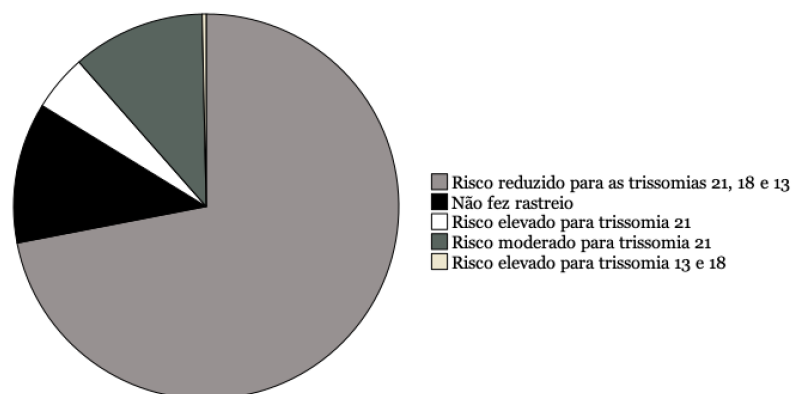


Figura 8: Gráfico circular com a distribuição dos resultados do rastreo combinado do primeiro trimestre.

O desempenho do RCPT na amostra foi avaliado com base nos seus resultados, onde as classificações de risco elevado e risco intermédio para trissomias foram interpretadas como resultados positivos. Foram registados 45 falsos positivos, 3 verdadeiros positivos, 213 verdadeiros negativos e 0 falsos negativos para as três principais trissomias. Os cálculos demonstraram que o teste apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 82,6% para a T21, T18 e T13, com um valor preditivo negativo de 100% dentro desses mesmos limites. O valor preditivo positivo foi de 6,25%, refletindo a possibilidade diminuída de um resultado positivo corresponder sempre a uma aneuploidia confirmada.

Tabela 11: Parâmetros de desempenho do RCPT.

Parâmetro	Valor
Verdadeiro Positivo	n=3 (1,2%)
Falso Positivo	n= 45 (17,2%)
Verdadeiro Negativo	n=213 (81,6%)
Falso Negativo	n=0 (0%)
Sensibilidade	100%
Especificidade	82,6%
Valor Preditivo Negativo	100%
Valor Preditivo Positivo	6,25%

Para avaliar a associação entre os resultados do RCPT e a presença ou ausência de aneuploidia nos fetos, foi inicialmente realizado um teste do Qui-quadrado. Contudo, uma vez que os pressupostos do teste não se verificaram, optou-se pelo Teste Exato de Fisher. Os resultados demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ( $p < 0,001$ ). O coeficiente de associação V de Cramer foi de 0,227, indicando uma associação fraca entre os resultados do RCPT e a presença de aneuploidia.

### 3.3 Resultados dos Testes NIPT

Da amostra total de 296 NIPT, 289 (97,6%) apresentaram um resultado indicativo de baixa probabilidade de aneuploidias e, em alguns casos, microdeleções/duplicações específicas, incluindo as regiões cromossômicas 1p36, 4p16.3, 5p15.2, 15q11.2, 22q11.2; em 7 testes, no entanto, o resultado foi de alta probabilidade para aneuploidias, dos quais 4 (1,4%) apresentaram alta probabilidade de T21, 2 (0,7%) alta probabilidade de Síndrome de Klinefelter (trissomia XXY) e 1 (0,3%) alta probabilidade de T13. Destes, 6 confirmaram-se verdadeiros positivos (4 T21 e 2 trissomia XXY), enquanto 1 (0,3%) foi

considerado um falso positivo (T13). Para além disso, dois casos com resultado inicial de baixa probabilidade de aneuploidia revelaram-se posteriormente como portadores de anomalias cromossómicas - um caso de triploidia 69, XXX e outro de trissomia do X. Contudo, estes resultados não são classificados como falsos negativos, visto que o teste utilizado (Harmony) apenas rastreava as trissomias 21, 18 e 13 e não detetava casos de triploidia.

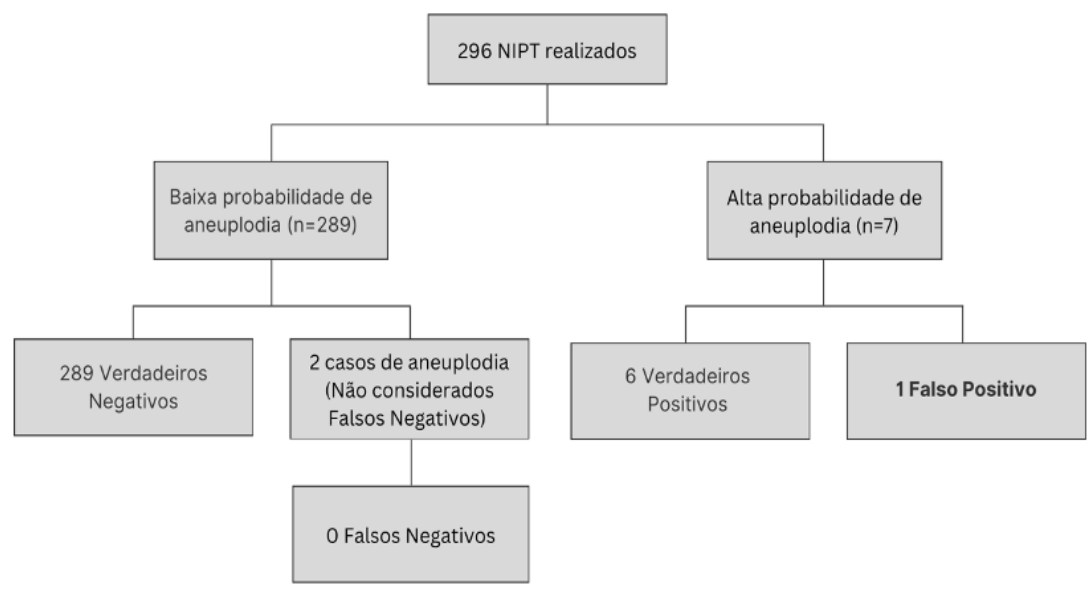


Figura 9: Resultados dos testes pré-natais não invasivos.

### 3.3.1 Tipos de teste utilizados

Neste estudo, os testes pré-natais não invasivos utilizados são das marcas *TRUST*, *HARMONY*, *TOMORROW* e *Prenatest*. Estes variam na abrangência das alterações cromossómicas que conseguem identificar. A maioria foca-se exclusivamente na deteção das trissomias mais comuns, como a Trissomia 21, Trissomia 18 e Trissomia 13. Outros incluem também a avaliação de aneuploidias dos cromossomas sexuais, como a Monossomia do X (Síndrome de Turner) ou outras alterações nos cromossomas X e Y. Para além destes, alguns testes mais abrangentes analisam todos os 23 pares de cromossomas, permitindo a deteção de aneuploidias em qualquer cromossoma, bem como 84 microdeleções/deleções específicas, incluindo as regiões cromossómicas 1p36, 4p16.3, 5p15.2, 15q11.2, 22q11.2.

A escolha do teste mais adequado dependeu do nível de detalhe pretendido, do risco individual da gravidez e das possibilidades económicas das gestantes, uma vez que,

inicialmente, nenhum destes testes era participado no CHUCB. Atualmente, apenas o teste que analisa as trissomias 21, 18 e 13 é participado, e exclusivamente para grávidas com risco intermédio de aneuploidias, de acordo com a Norma de Orientação Clínica da DGS de 1 de março de 2024.

### 3.3.2 Fração fetal obtida

Em relação à Fração Fetal obtida no NIPT, em 77 gestações (26%) este dado não estava disponível no processo clínico eletrónico. Nas restantes 219 gestações (74%) em que a FF foi apurada, o valor mínimo obtido foi de 3% e o valor máximo foi de 28%, com uma média de 10,4% e um desvio padrão de 3,92. Para estes cálculos, apenas os valores disponíveis foram considerados. Atualmente, recomenda-se que cada laboratório realize a sua própria validação interna, estabeleça o limite de deteção e defina um limiar de confiança para resultados inconclusivos. A maioria dos testes utilizados utilizou um *cut-off* de 2%, embora alguns apresentassem um limite de 4%.

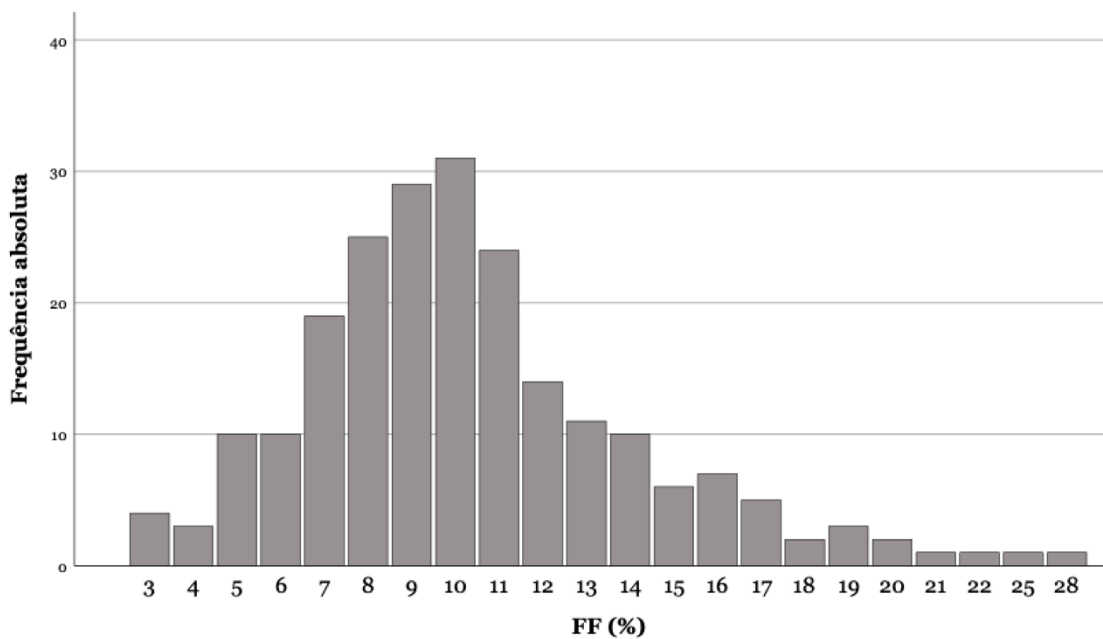


Figura 10: Gráfico de barras com a distribuição da Fração Fetal dos NIPT da amostra.

### 3.3.3. Desempenho do NIPT

O desempenho do NIPT na amostra foi avaliado com base nos seus resultados, tendo sido registados 1 falso positivo, 6 verdadeiros positivos, 289 verdadeiros negativos e 0 falsos negativos para as aneuploidias rastreadas pelo teste. No entanto, verificaram-se 2 casos em que os fetos eram aneuploides apesar de o NIPT ter apresentado um resultado de baixa probabilidade para aneuploidia, uma vez que os testes realizados nesses casos apenas analisavam as trissomias 21, 18 e 13, não sendo capazes de detetar as aneuploidias identificadas posteriormente. Tendo isto em consideração, os cálculos demonstraram que o teste apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 99,65% para as aneuploidias incluídas no seu painel de rastreio, com um valor preditivo negativo de 100% dentro desses mesmos limites. O valor preditivo positivo foi de 85,7%, refletindo a possibilidade de um resultado positivo não corresponder sempre a uma aneuploidia confirmada.

Tabela 12: Parâmetros de desempenho do NIPT.

Parâmetro	Valor
Verdadeiro Positivo	n=6 (2%)
Falso Positivo	n=1 (0,3%)
Verdadeiro Negativo	n=289 (97,7%)
Falso Negativo	n=0 (0%)
Sensibilidade	100%
Especificidade	99,65%
Valor Preditivo Negativo	100%
Valor Preditivo Positivo	85,7%

### 3.3.4. Associação entre os resultados dos NIPT e a presença ou ausência de aneuploidias nos fetos

Para avaliar a associação entre os resultados dos NIPT e a presença ou ausência de aneuploidia nos fetos, foi inicialmente realizado um teste do Qui-quadrado. No entanto, dado que não se verificaram os pressupostos do teste, optou-se pelo Teste Exato de Fisher. Os resultados demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ( $p < 0,001$ ). O coeficiente de associação de V de Cramer foi de 0,924, indicando uma associação muito forte.

### **3.3.5. Análise da proporção de FP em relação a um limiar de 1%**

Para avaliar se a proporção de falsos positivos observada na amostra (0,3%) é significativamente inferior a 1%, foi aplicado um teste binomial, em que a hipótese nula formulada foi “a proporção de FP é maior ou igual a 1%”.

O teste binomial resultou num p-valor de 0,204 ( $>0,05$ ), indicando que não há evidências estatísticas suficientes para rejeitar a hipótese nula. Assim, embora a proporção observada (0,3%) seja inferior a 1%, os dados não permitem concluir, com significância estatística, que a verdadeira proporção de FP na população é significativamente menor que 1%. Este resultado sugere que a diferença observada pode dever-se a variação amostral, e que uma amostra maior poderia esclarecer melhor esta questão.

### **3.3.6. Resultados inconclusivos**

Embora não tenham sido incluídos na amostra final para análise estatística, durante a recolha de dados foram registados 4 NIPT com resultados inconclusivos, representando 1% do total de NIPT realizados. Em 2 gestações, a repetição do teste forneceu um resultado conclusivo, indicando baixa probabilidade de aneuploidia. No entanto, em uma gestação, a repetição do teste resultou novamente em um resultado inconclusivo.

### **3.3.7. Falso positivo**

O resultado falso positivo ocorreu numa grávida de 35 anos G5A2P2, sem antecedentes familiares de anomalias congénitas. As gestações que resultaram em nados-vivos ocorreram sem intercorrências e os fetos eram euploides. O grupo de sangue da grávida era O Rh+, era apenas medicada para hipertensão arterial com Metildopa 250 miligramas uma vez por dia. Não era fumadora e negava hábitos etílicos. Apresentava 64,5 quilogramas, sem indicação no registo clínico sobre a sua altura. A gravidez era de feto único e foi espontânea, sem recurso a métodos de procriação medicamente assistida. Apresentou uma infeção do trato urinário no primeiro trimestre da gravidez que ainda não tinha sido resolvida aquando da realização do NIPT. Em relação aos testes realizados no primeiro trimestre de gravidez, realizou ecografia sem alterações e o rastreio combinado teve resultado de baixo risco para aneuploidias. Não desejava realizar amniocentese ou BVC e foi-lhe prescrito o teste pré-natal não invasivo a pedido da grávida. Realizou o NIPT às 14

semanas + 4 dias de gestação, com uma fração fetal de 8,6%, cujo resultado revelou risco elevado para trissomia 13. Embora não fosse o desejo da grávida antes de realizar o NIPT, optou, após este resultado de alto risco, realizar uma amniocentese confirmatória que revelou feto euploide 46, XX. A grávida referia muita ansiedade enquanto aguardava pelo resultado da amniocentese.

### **3.3.8. Realização de teste confirmatório/ diagnóstico após NIPT com resultado de risco elevado de aneuploidia**

Dos 7 testes com alta probabilidade para aneuploidia, seis confirmaram-se como verdadeiros positivos (quatro casos de trissomia 21 e dois de trissomia XXY), enquanto um (0,3%) foi classificado como falso positivo (trissomia 13). No entanto, o teste confirmatório do resultado do NIPT (amniocentese), foi realizado apenas em seis gestantes (que revelou 4 fetos com trissomia 21, 1 com trissomia XXY e um feto euploide com risco elevado para T13 no NIPT). O caso que não foi confirmado por testes invasivos envolveu um feto com risco elevado para trissomia XXY no NIPT. A gestante, de 37 anos e com histórico pessoal de infertilidade, optou por não realizar a amniocentese mesmo após aconselhamento por parte da obstetra, devido ao risco de aborto espontâneo ou outras complicações associadas a este método invasivo. Este caso de trissomia foi, posteriormente, confirmado à nascença.

## **3.4. Cariótipo e fenótipo fetal**

Relativamente ao cariótipo e fenótipo fetal, em 289 fetos (94,1%) não foram identificadas anomalias congénitas ou aneuploidias. O NIPT detetou aneuploidias em 6 fetos (2%) portadores de trissomia, nomeadamente 4 casos de trissomia 21 e 2 casos de Síndrome de Klinefelter. Desses, 5 casos foram confirmados por amniocentese, enquanto 1 dos casos de Síndrome de Klinefelter foi confirmado após o nascimento. No entanto, em 2 fetos (0,7%), foram posteriormente identificadas aneuploidias não detetadas pelo NIPT, devido ao teste utilizado, que apenas permitia a deteção das três principais trissomias (T21, T18 e T13). Nestes casos, os fetos apresentavam triploidia 69,XXX e trissomia do X, elevando o total de fetos com aneuploidia para 8 casos. O diagnóstico de triploidia foi confirmado por amniocentese, enquanto a trissomia do X foi apenas identificada após o nascimento. Para além disso, foram detetadas anomalias congénitas em 10 fetos (3,2%), incluindo anomalias cardíacas, do sistema nervoso central, do aparelho digestivo e urinário, entre outras, que não são detetáveis pelo NIPT.

### **3.5. Desfechos gestacionais**

Em relação aos desfechos gestacionais, dos 307 fetos incluídos no estudo, 300 (97,7%) resultaram em nados-vivos, enquanto 6 (2%) culminaram em interrupção médica da gravidez e 1 (0,3%) resultou em óbito fetal após 40 semanas de gestação. Este caso correspondeu a uma morte fetal intrauterina ocorrida antes do trabalho de parto relacionada com uma complicação aguda da circulação placentária. Não foram identificadas malformações fetais nem aneuploidias associadas.

#### **3.5.1. Desfecho dos fetos com aneuploidia**

Dos 307 fetos estudados, 8 apresentaram aneuploidia: 4 fetos com trissomia 21, 2 com síndrome de Klinefelter (trissomia XXY), 1 com trissomia do X e 1 com triploidia 69, XXX. Em 5 destes casos, a gestação foi interrompida por IMG, incluindo 4 fetos com trissomia 21 (um dos quais em gestação gemelar bicoriónica e biamniótica, onde foi realizado um feticídio seletivo do feto com T21, permitindo a continuidade da gestação do feto não afetado) e no caso de triploidia 69, XXX. Os restantes casos resultaram em nados-vivos. Assim, os progenitores optaram por interromper a gestação em 62% dos casos totais de aneuploidia identificados nesta amostra. No entanto, considerando unicamente as gestações em que o diagnóstico de aneuploidia foi conhecido antes do nascimento, a taxa de interrupção foi de 71,4%. Em ambos os casos de Síndrome de Klinefelter, a gestação prosseguiu, conforme estipulado pela legislação vigente.

No caso da trissomia do X, o diagnóstico foi estabelecido apenas após o nascimento, uma vez que a aneuploidia não foi detetada pelo NIPT devido a se tratar de um teste com espectro de rastreio limitado, que analisava exclusivamente os cromossomas 21, 18 e 13, não abrangendo, por isso, aneuploidias dos cromossomas sexuais. Como o resultado do teste foi negativo, os progenitores optaram por não realizar amniocentese.

#### **3.5.2. IMG de feto euploide**

Em adição aos 5 casos de IMG referidos anteriormente, foi realizada 1 IMG de um feto cujo NIPT apresentou resultado de baixa probabilidade de aneuploidia, porém apresentava um mau prognóstico fetal com rotura prematura de membranas com oligoamnios severo às 21 semanas + 4 dias. Após a IMG, foi realizada uma biópsia

## Falsos Positivos e Negativos dos NIPT (ADN fetal livre) em grávidas do CHUCB

da pele do feto com extração de ADN fetal que foi submetido a uma análise de marcadores por QF-PCR. Esta análise não detetou qualquer alteração no número de cópias dos cromossomas 21, 18, 13, X e Y, revelando, assim, que o NIPT estava correto.



## 4. Discussão

O presente estudo avaliou o desempenho dos NIPT na detecção de aneuploidias fetais em grávidas seguidas nas consultas de DPN e obstetrícia do Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, desde fevereiro de 2016 até junho de 2024. A amostra incluiu 296 gestações, predominantemente de alto risco: 82,1% das gestantes tinham idade igual ou superior a 35 anos, 17,9% recorreram a técnicas de procriação medicamente assistida e 16,2% possuíam resultados do Rastreo Combinado do Primeiro Trimestre com risco moderado ou elevado para as trissomias 21, 18 e 13. Apenas uma pequena percentagem correspondeu a gestantes de baixo risco para aneuploidias que optaram pelo teste motivadas por ansiedade, procurando segurança adicional além do rastreio tradicional. A maioria das gestantes escolheu o NIPT como alternativa a métodos invasivos, principalmente devido ao receio das complicações associadas à amniocentese e BVC, como o risco de aborto espontâneo. Dessas 296 gestações, 289 (97,6%) tiveram um resultado de baixa probabilidade de aneuploidia no NIPT, enquanto 7 (2,4%) foram classificadas como de alta probabilidade para aneuploidia. Entre estes últimos, 6 casos foram confirmados como verdadeiros positivos (4 casos de T21 e 2 casos de trissomia XXY) e 1 caso foi um falso positivo (T13 não confirmada por amniocentese).

A tabela 12 revela que o NIPT demonstrou uma sensibilidade de 100%, especificidade de 99,65%, valor preditivo positivo de 85,7% e valor preditivo negativo de 100% para as aneuploidias rastreadas. Estes resultados refletem um desempenho muito fiável, com elevada capacidade para identificar corretamente os casos positivos e excluir os negativos. A sensibilidade de 100% indica que o NIPT identificou corretamente todos os fetos com aneuploidia, sem ocorrência de falsos negativos, o que reforça a segurança deste teste na exclusão destas condições. A especificidade de 99,65% sugere um número muito reduzido de falsos positivos, embora estes ainda possam ocorrer, exigindo confirmação por métodos invasivos. O VPP de 85,7% indica que cerca de 14,3% dos resultados positivos foram falsos positivos, evidenciando que um teste positivo não deve ser considerado diagnóstico, mas sim um forte indicativo de risco. Destaca-se, assim, a necessidade de confirmação diagnóstica antes de tomar decisões clínicas definitivas. Por outro lado, o VPN de 100% garante que todas as grávidas com resultado negativo efetivamente não tinham fetos com as aneuploidias rastreadas pelo teste, tornando o NIPT um método altamente fiável para excluir estas alterações. Estes resultados vão ao encontro do que foi apontado por Thomas Liehr na sua meta-análise,

na qual diferentes estudos demonstraram que a taxa de FP dos NIPT é significativamente superior à de FN (24).

No entanto, uma limitação importante a considerar é que a maioria dos testes utilizados neste estudo eram testes simples, apenas capazes de rastrear as três principais trissomias, T21, T18 e T13. Assim, embora o NIPT tenha apresentado uma sensibilidade e VPN de 100%, indicando a inexistência de falsos negativos, existiram casos de fetos com aneuploidias específicas que não foram identificadas, uma vez que o teste não se comprometeu a detetá-las, nomeadamente um caso de trissomia do X e um caso de triploidia. Esta limitação deve ser tida em conta na interpretação dos resultados e na seleção do tipo de teste mais adequado consoante a suspeita clínica.

É de salientar que, no caso de triploidia 69, XXX, apesar do resultado do NIPT indicar baixa probabilidade de aneuploidia, o Rastreio Combinado do Primeiro Trimestre revelou uma probabilidade muito elevada para Trissomia 13 (1:5) e a ecografia evidenciou anomalias estruturais fetais. No entanto, neste caso, os progenitores recusaram numa fase inicial a realização de testes invasivos como a BVC e amniocentese, optando pela realização de um NIPT. Deste modo, é importante reforçar que o NIPT não deve substituir testes invasivos em gestantes com risco muito elevado de aneuploidia no RCPT ou na presença de anomalias ecográficas. Para além disso, o NIPT não deve ser recomendado para fetos com suspeita de triploidia. A maioria dos NIPT utiliza uma abordagem de contagem quantitativa, que se baseia na comparação do número absoluto de leituras de sequência do cromossoma de interesse com cromossomas de referência. A trissomia fetal é inferida quando esta razão excede um limiar pré-determinado. Como todos os cromossomas em fetos triploides são trissómicos o NIPT não consegue identificar a triploidia fetal, pois a presença de três cópias de todos os cromossomas mantém a proporção relativa de ADN fetal semelhante à de um feto euploide (25).

Por outro lado, a trissomia do X não foi identificada devido à utilização de um NIPT básico, que se limitou à análise dos cromossomas 21, 18 e 13 e excluiu a avaliação dos cromossomas sexuais. Neste caso, foi eliminada a indicação para a realização de métodos invasivos, como a BVC ou amniocentese, já que o RCPT e as ecografias durante a gestação não apresentaram alterações. Contudo, a trissomia do X poderia ter sido identificada com recurso a um NIPT ampliado, que incluísse a análise dos cromossomas sexuais. Estes achados sublinham a importância de informar as grávidas que um resultado negativo no NIPT não exclui a presença de todas as anomalias

cromossômicas em testes com um espectro de análise restrito. Assim, dos 8 fetos com aneuploidias identificadas neste estudo, apenas 7 (87,5%) foram identificadas no período pré-natal. O feto que, após o nascimento, se constatou ter trissomia do X, não foi identificado no período pré-natal, pelas razões supracitadas. Das 7 gestações com fetos com aneuploidia identificada no período pré-natal, 5 (71,4%) resultaram em interrupção médica da gravidez. Isto corresponde ao número total de fetos identificados com T21 e o feto com triploidia 69,XXX.

O Rastreio Combinado do Primeiro Trimestre apresentou uma sensibilidade de 100%, mas com uma especificidade inferior (82,6%) e uma elevada taxa de falsos positivos (17,2%) quando comparado com o NIPT (tabela 13). O VPP do RCPT foi de apenas 6,25%, indicando que uma proporção significativa dos casos classificados como risco elevado e intermédio neste rastreio não correspondem a fetos portadores de aneuploidia.

Para avaliar e comparar o desempenho dos dois testes na deteção de aneuploidias fetais, foi calculada a Razão de Verossimilhança (*Likelihood Ratio* – LR), uma medida que quantifica a capacidade de um teste em confirmar ou excluir a presença de aneuploidia. Os resultados obtidos demonstraram que o NIPT apresenta um LR+ (razão entre a probabilidade de um resultado positivo num feto com aneuploidia e a probabilidade de um resultado positivo num feto sem aneuploidia) de 285,71. Este valor é substancialmente superior ao do RCPT, que apresenta um LR+ de 5,75, refletindo, assim, uma maior capacidade do NIPT para confirmar a presença de aneuploidia fetal. Para além disso, o LR- (razão entre a probabilidade de um resultado negativo num feto com aneuploidia e a probabilidade de um resultado negativo num feto sem aneuploidia) foi de 0 em ambos os testes, indicando que um resultado negativo praticamente exclui a presença de aneuploidia em qualquer dos casos. Para mais informações sobre a Razão de Verossimilhança e a sua interpretação, recomenda-se a consulta de Azzalini (1996) (26).

Para além disso, a análise estatística evidenciou ainda uma associação muito forte entre os resultados do NIPT e a presença de aneuploidias (V de Cramer =0,924,  $p<0,001$ ), enquanto a associação do RCPT foi fraca (V de Cramer =0,227,  $p<0,001$ ).

## Falsos Positivos e Negativos dos NIPT (ADN fetal livre) em grávidas do CHUCB

Tabela 13: Comparação das métricas de desempenho do NIPT e RCPT.

Parâmetro	NIPT	RBPT
Verdadeiro Positivo	n=6 (2%)	n=3 (1,2%)
Falso Positivo	n=1 (0,3%)	n= 45 (17,2%)
Verdadeiro Negativo	n=289 (97,7%)	n=213 (81,6%)
Falso Negativo	n=0 (0%)	n=0 (0%)
Sensibilidade	100%	100%
Especificidade	99,65%	82,6%
Valor Preditivo Negativo	100%	100%
Valor Preditivo Positivo	85,7%	6,25%
V de Cramer	0,924	0,227
LR+	285,71	5,75
LR-	0	0

Os NIPT com resultado inconclusivo não foram incluídos na amostra final para análise estatística. Durante a recolha de dados foram registados 4 NIPT com resultados inconclusivos, representando 1% do total de NIPT realizados. Em 2 gestações, a repetição do teste forneceu um resultado conclusivo, indicando baixa probabilidade de aneuploidia. No entanto, em outra gestação, a repetição do teste demonstrou novamente um resultado inconclusivo. Neste tipo de casos, devemos informar os progenitores de que um resultado inconclusivo poderá ter mais risco de aneuploidias como T18, T13 e triploidia. Estas condições estão relacionadas a níveis baixos de PAPP-A, refletindo uma menor massa placentária e, por consequência, uma fonte reduzida de CffDNA e uma FF mais baixa. Assim, é de notar que mulheres com testes inconclusivos precisam de aconselhamento cuidadoso sobre eventuais testes adicionais, incluindo testes diagnósticos como a amniocentese (19).

Os falsos positivos no NIPT representam um desafio significativo, uma vez que podem levar à realização de testes invasivos desnecessários e causar um impacto emocional considerável nas gestantes. No presente estudo, foi identificado um caso de falso positivo para T13, que pode ser explicado pelo mosaicismo confinado à placenta – uma das principais causas de discordância entre os resultados do NIPT e os testes confirmatórios invasivos (27). Neste caso, apesar de inicialmente não pretender realizar um teste invasivo, a grávida optou por uma amniocentese após receber um resultado de alto risco para T13. O exame revelou um feto euploide 46,XX, confirmando que o resultado do NIPT era um falso positivo. Durante o período de espera, a gestante reportou níveis elevados de *stress* e ansiedade, o que reforça o impacto psicológico que estes resultados podem ter. Este achado ilustra dois dos principais problemas associados aos falsos positivos: a realização de procedimentos invasivos evitáveis e o

sofrimento emocional das gestantes. A literatura evidencia que a incerteza gerada por um resultado positivo no NIPT pode aumentar a ansiedade materna, sobretudo quando há necessidade de confirmação através de testes invasivos. Assim, é essencial garantir que as gestantes recebam aconselhamento adequado antes e depois da realização do teste, permitindo-lhes compreender as suas limitações e tomar decisões informadas sobre a necessidade de exames adicionais. Para além disso, dada a possibilidade de FP, é essencial reforçar a necessidade de testes invasivos para confirmar o diagnóstico após um resultado positivo no NIPT. Embora tal não tenha ocorrido no CHUCB, há relatos de grávidas que interromperam a gestação sem a confirmação diagnóstica de aneuploidia, podendo, nesses casos, ter abortado um feto saudável (28).

A taxa de falsos positivos observada neste estudo (0,3%) está alinhada com a literatura, que geralmente reporta taxas inferiores a 1% (Dai et al., 2021)(29). No entanto, o teste binomial não permitiu rejeitar a hipótese nula de que a proporção verdadeira seja maior ou igual a 1% ( $p=0,204$ ). Este resultado sugere que a diferença observada pode dever-se à variação amostral, ou seja, que a amostra utilizada pode não ter sido suficientemente grande para demonstrar uma diferença estatisticamente significativa. Assim, embora os dados apontem para uma baixa taxa de falsos positivos, a incerteza estatística reforça a necessidade de estudos com um maior número de casos para confirmar essa tendência. Adicionalmente, estes achados sublinham a importância de considerar o tamanho da amostra ao interpretar resultados de precisão diagnóstica, pois estimativas provenientes de amostras reduzidas podem não refletir com exatidão a realidade populacional.

Do ponto de vista prático, os dados analisados sugerem que, para as aneuploidias rastreadas pelo Rastreamento Combinado do Primeiro Trimestre, a realização do NIPT básico (que rastreia exclusivamente os cromossomas 21, 18 e 13) seria apenas necessária nos casos em que o RCPT apresentasse um resultado positivo (risco elevado ou risco intermédio) ou para as gestantes que não o realizaram. Essa abordagem justifica-se pelo facto de todos os fetos diagnosticados com essas trissomias apresentarem um resultado positivo no RCPT, quando realizado. Contudo, uma grávida com feto portador de trissomia 21 não realizou RCPT. No entanto, todos os resultados negativos foram confirmados como verdadeiros, indicando que este método inicial continua a ser uma ferramenta eficaz de triagem. Desta forma, a implementação de um protocolo baseado na estratificação do risco permite reservar o NIPT básico para os casos em que há uma real suspeita das aneuploidias previamente mencionadas, otimizando recursos e evitando a realização de testes desnecessários, uma vez que, no

estudo, todas as gestantes com RCPT negativo que realizaram NIPT básico não apresentaram um valor diagnóstico adicional com realização do teste.

Para além disso, os resultados deste estudo também evidenciam uma das limitações do NIPT básico, que se restringe à análise dos cromossomas 21, 18 e 13, como ilustrado no caso da trissomia do X não detetada. Para outras aneuploidias que não são identificáveis pelo RCPT, como as aneuploidias dos cromossomas sexuais, trissomias dos restantes cromossomas ou algumas microdeleções, o NIPT ampliado assume um papel muito relevante, uma vez que permite detetar aneuploidias que passariam despercebidas com a realização do teste básico. Nestes casos, a escolha de um painel mais abrangente deve ser ajustada conforme a suspeita clínica e considerada em função do contexto específico de cada gestante. Fatores como antecedentes obstétricos, achados ecográficos sugestivos e o contexto financeiro dos pais devem ser ponderados na decisão sobre o teste a realizar. O NIPT com capacidade de análise alargada a múltiplos cromossomas pode reduzir o risco de aneuploidias não identificadas, como as aneuploidias dos cromossomas sexuais, que constituem 16% das anomalias cromossómicas detetadas no período pré-natal, e podem apresentar consequências fenotípicas, endócrinas, cognitivas ou comportamentais. No entanto, a sua utilização generalizada deve ser ponderada, dado o custo mais elevado e a possibilidade de identificar variantes de significado incerto, o que pode gerar ansiedade e investigações invasivas desnecessárias (30). Assim, é essencial que as grávidas sejam informadas sobre as limitações dos diferentes tipos de NIPT, permitindo uma escolha informada e adequada ao seu caso específico. Embora vários estudos, incluindo o de Wilkins-Haug et al. (31), apontem para que a precisão do NIPT na deteção de aneuploidias dos cromossomas sexuais seja inferior à verificada para as aneuploidias autossómicas mais comuns, no presente estudo verificou-se que todas as grávidas cujos fetos apresentavam cromossomopatias sexuais e realizaram um NIPT mais abrangente foram corretamente diagnosticadas. Este achado contraria, em certa medida, a literatura existente, mas deve ser interpretado com cautela, uma vez que a amostra reduzida poderá ter influenciado os resultados.

Adicionalmente, o estudo reforça a importância de confirmar resultados positivos do NIPT com testes invasivos, uma vez que a especificidade do teste, apesar de elevada, não é absoluta. Das 7 gestantes que receberam um resultado de elevada probabilidade de aneuploidia no NIPT, todas foram informadas sobre a necessidade de confirmação diagnóstica através de um teste invasivo. No entanto, apenas 6 optaram por realizar a amniocentese. A única grávida que recusou realizar o procedimento, de 37 anos, decidiu não prosseguir com o teste invasivo, uma vez que não considerava interromper a gravidez, mesmo em caso de confirmação da Síndrome de Klinefelter. A sua decisão

foi motivada pela vontade de evitar os riscos associados a testes invasivos, como o risco de aborto espontâneo, e pela aceitação da condição genética do feto, caso confirmada. De acordo com a *International Society for Prenatal Diagnosis*, o teste diagnóstico é fortemente recomendado caso os progenitores considerem a interrupção da gravidez devido à presença de aneuploidia fetal. No entanto, algumas gestantes realizam o NIPT somente para obter informação e optam por não avançar para testes invasivos, mesmo perante um resultado positivo (32). Esse foi o caso da grávida com feto portador de Síndrome de Klinefelter. Assim, a decisão da gestante de recusar a amniocentese, mesmo com NIPT positivo, sublinha a importância dos profissionais de saúde respeitarem a autonomia reprodutiva das mulheres e garantirem que as suas decisões são tomadas de forma informada e consciente.

Este estudo também destaca a importância do aconselhamento genético antes da realização do NIPT, especialmente para mulheres de baixo risco para aneuploidias, como recomendado pela *Society for Maternal-Fetal Medicine* (SMFM). A SMFM enfatiza que, embora o NIPT não seja recomendado como teste de primeira linha para grávidas de baixo risco para aneuploidias, a opção deve estar disponível para as gestantes que o solicitem, desde que compreendam as limitações e benefícios do teste (19).

Do ponto de vista teórico, este estudo contribui para a literatura existente ao fornecer dados sobre o desempenho do NIPT numa população específica. Destaca-se a importância de considerar fatores como a fração fetal e o espectro de análise do teste. Este estudo é particularmente relevante no contexto da região da Beira Interior, onde concelhos como Penamacor, Sabugal, Guarda, Celorico da Beira e Pinhel apresentam uma prevalência superior a 300 casos de anomalias congénitas por cada 10.000 nascimentos, e concelhos que fazem fronteira com a Covilhã, como Seia e Belmonte, apresentam uma prevalência de 200-299,9 casos por cada 10.000 nascimentos (4). Esses dados demonstram a importância deste estudo no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, que recebe grávidas residentes nestas localidades e reforçam a necessidade de um rastreio pré-natal eficaz e adaptado a esta população. Neste contexto, seria importante a realização futura de estudos multicêntricos para avaliar se a elevada prevalência de anomalias congénitas na Beira Interior justifica a adoção de protocolos diferenciados, nomeadamente uma maior utilização do NIPT ampliado, de modo a melhorar a deteção precoce de aneuploidias fetais, como as trissomias dos cromossomas sexuais.

Para além de validar o NIPT como uma ferramenta eficaz para rastreio de aneuploidias, os resultados deste estudo evidenciam as suas limitações, especialmente na deteção de

triploidias e em testes com um espectro de análise mais restrito, nos quais alterações cromossômicas, como as aneuploidias dos cromossomas sexuais, entre outras, não conseguem ser identificadas.

Os achados do presente estudo reforçam a importância de protocolos integrados e personalizados no rastreio pré-natal. Antes do começo deste estudo, a aplicação sistemática de um protocolo estruturado para o uso do NIPT no rastreio de aneuploidias não estava amplamente implementado em Portugal. No entanto, durante a realização deste trabalho, a Direção-Geral de Saúde publicou, em março de 2024, uma norma que estabeleceu critérios específicos para a utilização do NIPT em gestantes com risco intermédio (11). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que esta abordagem, que integra seletivamente o NIPT como complemento ao RCPT, pode aumentar a eficiência dos programas de rastreio e reduzir a realização de testes desnecessários. Assim, o presente estudo contribui para a validação da pertinência da nova norma, evidenciando o seu potencial para otimizar a gestão de recursos e garantir que as gestantes recebam o cuidado mais adequado ao seu perfil de risco e às suas necessidades individuais.

Adicionalmente, a SMFM recomenda que o aconselhamento genético seja um requisito antes da realização do NIPT, especialmente para mulheres de baixo risco para aneuploidias (19). Esta prática poderia não só contribuir para uma melhor compreensão das limitações do teste, como também ajudar a reduzir a ansiedade associada a falsos positivos, garantindo que as gestantes estejam plenamente informadas antes da decisão de realizar o exame.

#### **4.1 Limitações do estudo**

Algumas limitações foram identificadas neste estudo, nomeadamente a dimensão da amostra, composta por 296 gestações. Este poderia beneficiar de um maior número de casos para aumentar a robustez estatística. Esta limitação está relacionada com a inexistência de uma lista completa de todas as grávidas seguidas no Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira que efetuaram teste pré-natal não invasivo entre fevereiro de 2016 e junho de 2024. A ausência dessa lista pode ter dificultado a inclusão de todas as gestantes elegíveis, restringindo o tamanho da amostra e, conseqüentemente, limitando a representatividade dos resultados. Para além disso, algumas grávidas realizaram o parto noutras instituições que não o CHUCB ou não foram seguidas durante toda a gestação neste hospital, tendo sido necessário reduzir a amostra inicial.

Adicionalmente, a ausência de algumas informações no processo clínico eletrônico, nomeadamente sobre a fração fetal e o tipo de teste utilizado, pode ter influenciado a análise dos fatores associados à precisão do teste. Outra limitação deste estudo é a composição da amostra, que é predominantemente constituída por grávidas de alto risco, nomeadamente com idade materna avançada (>35 anos) e histórico de infertilidade. Isso pode influenciar a taxa de falsos positivos e falsos negativos do NIPT e limitar a generalização dos resultados para populações de baixo risco para aneuploidias, onde o desempenho do teste pode diferir.

Estas limitações devem ser tidas em consideração na interpretação dos resultados do estudo, uma vez que podem ter influenciado tanto a representatividade da amostra como a precisão das conclusões.



## 5. Conclusão

Este estudo demonstrou que, na amostra de grávidas seguidas em consultas de DPN e obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, o teste pré-natal não invasivo apresentou um desempenho muito elevado na deteção de aneuploidias fetais, como a trissomia 21, 18 e 13 e Síndrome de Klinefelter, com sensibilidade de 100%, especificidade de 99,65% e uma taxa de falsos positivos muito baixa (0,3%), sem registo de falsos negativos. Comparado ao RCPT, o NIPT mostrou-se significativamente superior, reduzindo a taxa de falsos positivos de 17,2% para 0,3% e garantindo melhor segurança para as gestantes.

Contudo, os resultados deste estudo, nomeadamente a presença de um resultado falso positivo, reforçam que o NIPT não deve ser considerado um teste de diagnóstico definitivo, mas sim uma ferramenta de rastreio com elevado desempenho, cujos resultados positivos necessitam de confirmação com recurso a métodos invasivos.

Para além disso, o estudo evidenciou que limitações de testes básicos (que analisam apenas os cromossomas 21, 18 e 13) podem levar à não deteção de outras aneuploidias, como trissomias dos cromossomas sexuais. Isso ressalta a importância de escolher painéis de rastreio adequados ao perfil de risco da gestante e de as informar com clareza sobre as limitações do teste utilizado.

A combinação do rastreio combinado do primeiro trimestre com o NIPT, aplicado de forma seletiva, aumenta a eficiência dos programas de rastreio pré-natal, reduzindo a realização de testes invasivos desnecessários.

É de salientar a importância de um aconselhamento genético adequado prévio e após a realização do NIPT para garantir que as gestantes conseguem fazer decisões informadas e que estão corretamente instruídas sobre os benefícios e limitações do NIPT.

Apesar do elevado desempenho do teste, a ocorrência de resultados incorretos ainda representa um desafio clínico. Estes podem levar a decisões médicas inadequadas, causando ansiedade desnecessária nas gestantes ou não identificar condições genéticas fetais. É essencial compreender os fatores que podem contribuir para esses erros e avaliar o desempenho do NIPT em diferentes contextos clínicos.

Em conclusão, o NIPT é uma ferramenta valiosa no rastreio pré-natal, mas deve ser utilizado com cautela e transparência tendo presente as suas limitações e benefícios e em conjunto com outras técnicas de rastreio e diagnóstico para garantir a precisão dos resultados e a segurança das gestantes e dos fetos, que não depende exclusivamente da tecnologia, mas de uma prática clínica ética, informada e centrada no paciente.



## 6. Referências bibliográficas

1. Carbone L, Cariati F, Sarno L, Conforti A, Bagnulo F, Strina I, et al. Non-Invasive Prenatal Testing: Current Perspectives and Future Challenges. 2020; Available from: <https://doi.org/10.3390/genes12010015>
2. Cuckle H, Morris J. Maternal age in the epidemiology of common autosomal trisomies. Vol. 41, Prenatal Diagnosis. John Wiley and Sons Ltd; 2021. p. 573–83.
3. EUROCAT. EUROCAT website [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 24]. Available from: [https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence\\_en](https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence_en)
4. Braz P, Machado A, Roquette R, Matias Dias C. Registo Nacional de Anomalias Congénitas [Internet]. Lisboa; 2021. Available from: [www.insa.pt](http://www.insa.pt)
5. Miragaia TM, Nunes JF, Sampaio AF, Correia SF. Testes pré-natais não invasivos para rastreio de aneuploidias: revisão baseada na evidência. Revista Portuguesa de Clínica Geral [Internet]. 2020 May 1;36(3):253–64. Available from: <https://rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/12547>
6. Programa Nacional para a Vigilância da Gravidez de Baixo Risco [Internet]. Lisboa; 2015. Available from: [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)
7. Geppert J, Stinton C, Johnson S, Clarke A, Grammatopoulos D, Taylor-Phillips S. Update of a systematic review on prenatal cell-free DNA testing for fetal trisomies 21, 18 and 13 (twin/multiple pregnancies and DNA microarray technology) External review against programme appraisal criteria for the UK National Screening Committee [Internet]. 2019. Available from: [www.gov.uk/uknsc](http://www.gov.uk/uknsc)
8. APDPN. Associação Portuguesa de Diagnóstico Pré Natal [Internet]. [cited 2024 Sep 24]. Available from: <https://www.apdpn.com/pt/historia>
9. Ministério da Saúde. Despacho n.º 5411-97, de 6 de agosto. Diário da República. 1997;2ª Série(180):9509–10. 1997.
10. Walter A, Simonini C, Gembruch U, Flöck A, Strizek B, Geipel A. First Trimester Screening - Current Status and Future Prospects After Introduction of Non-invasive Prenatal Testing (NIPT) at a Tertiary Referral Center. Geburtshilfe Frauenheilkd. 2022 Sep 30;82(10):1068–73.
11. Direção-Geral da Saúde. Orientação n.º 01/2024 - Pesquisa do DNA fetal, circulante no sangue materno, no rastreio de aneuploidias do primeiro trimestre (Trissomia 21, 18 e 13) [Internet]. 2024 Mar. Available from: [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)



12. Alfirevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Vol. 2017, Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2017.
13. Casanova R, Goepfert A, Hueppchen N, Weiss P, Connolly A. Beckmann and Ling's Obstetrics and Gynecology . 9th edition. 2023.
14. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2015 Jan 1;45(1):16–26.
15. Alberry MS, Aziz E, Ahmed SR, Abdel-fattah S. Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2021 Mar 1;258:424–9.
16. Romero R. A Profile of Dennis Lo, DM, DPhil, FRCP, FRCPath, FRS. Vol. 218, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2018. p. 371–8.
17. Deng C, Liu S. Factors Affecting the Fetal Fraction in Noninvasive Prenatal Screening: A Review. Vol. 10, *Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A.; 2022.
18. Society for Maternal-Fetal Medicine. Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Jun 1;212(6):711–6.
19. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Consult Series #36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. Vol. 212, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2015. p. 711–6.
20. Bedei I, Wolter A, Weber A, Signore F, Axt-Flidner R. Chances and challenges of new genetic screening technologies (NIPT) in prenatal medicine from a clinical perspective: A narrative review. *Genes (Basel)*. 2021 Apr 1;12(4).
21. Griffin B, Edwards S, Chitty LS, Lewis C. Clinical, social and ethical issues associated with non-invasive prenatal testing for aneuploidy. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology*. 2018 Jan 2;39(1):11–8.
22. Non-invasive prenatal testing: ethical issues. London: Nuffield Council on Bioethics; 2017.
23. Jayashankar SS, Nasaruddin ML, Hassan MF, Dasrilsyah RA, Shafiee MN, Ismail NAS, et al. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT): Reliability, Challenges, and Future Directions. Vol. 13, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
24. Liehr T. False-positives and false-negatives in non-invasive prenatal testing (NIPT): what can we learn from a meta-analyses on > 750,000 tests? *Mol Cytogenet*. 2022 Dec 1;15(1).

25. Park JE, Park JK, Kang MY, Cho IA, Baek JC. Counting-based cell-free DNA screening test fails to identify triploidy—A case report. *Clin Case Rep.* 2019 Jan 1;7(1):90–3.
26. Azzalini A. *Statistical Inference Based on the Likelihood.* Chapman & Hall/CRC; 1996.
27. Hartwig TS, Ambye L, Sørensen S, Jørgensen FS. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT) – a systematic review. Vol. 37, *Prenatal Diagnosis.* John Wiley and Sons Ltd; 2017. p. 527–39.
28. Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* Mosby Inc.; 2014. p. 527.e1-527.e17.
29. Dai R, Yu Y, Zhang H, Li L, Jiang Y, Liu R, et al. Analysis of 17,428 pregnant women undergoing non-invasive prenatal testing for fetal chromosome in Northeast China. *Medicine (United States).* 2021 Feb 12;100(6):E24740.
30. Christiaens L, Chitty LS, Langlois S. Current controversies in prenatal diagnosis: Expanded NIPT that includes conditions other than trisomies 13, 18, and 21 should be offered. Vol. 41, *Prenatal Diagnosis.* John Wiley and Sons Ltd; 2021. p. 1316–23.
31. Wilkins-Haug L, Reimers R. Unique Challenges of NIPT for Sex Chromosome Aneuploidy. *Clin Obstet Gynecol.* 2023 Sep 1;66(3):568–78.
32. Hui L, Ellis K, Mayen D, Pertile MD, Reimers R, Sun L, et al. Position statement from the International Society for Prenatal Diagnosis on the use of non-invasive prenatal testing for the detection of fetal chromosomal conditions in singleton pregnancies. Vol. 43, *Prenatal Diagnosis.* John Wiley and Sons Ltd; 2023. p. 814–28.



## 7. Anexos

### 7.1. Anexo I – Parecer da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira

	<b>IMPRESSO</b> <b>Parecer da Comissão de Ética para a Saúde</b> Código: CHUCB.IMP.COMET.01 Edição: 5 Revisão: 1
<b>Parecer nº:</b> 58/2023	<b>Data:</b> 2023/12/22
<b>Assunto:</b> Estudo nº 67/2023 - "Análise da Taxa de Falsos Positivos e Falsos Negativos dos Testes Pré-natais Não Invasivos /NIPT/Cell-free DNA) realizados em grávidas seguidas no Serviço de Obstetria do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira"	
<b>Membros da CE do CHUCB:</b>  Prof. Doutor Manuel Passos Morgado (Presidente, Farmacêutico)  Dra. Ana Paula Torgal Carreira (Vice-Presidente, Assistente Social)  Dr. Luís Manuel Ribeiro (Médico)  Enf. Maria Gabriela Ramalhinho (Enfermeira)  Dra. Maria Teresa Bordalo Santos (Psicóloga)  Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro (Jurista)  Dr. António Luciano Costa (Teólogo)	Exma. Senhora Investigadora: Sara Filipa da Cruz Pinheiro  A Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, em reunião realizada em 2023/12/21 deliberou emitir parecer relativamente à realização do Estudo nº 67/2023 - "Análise da Taxa de Falsos Positivos e Falsos Negativos dos Testes Pré-natais Não Invasivos /NIPT/Cell-free DNA) realizados em grávidas seguidas no Serviço de Obstetria do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira"  <b>Membros da CES do CHUCB presentes:</b> Prof. Doutor Manuel Passos Morgado Dra. Ana Paula Torgal Carreira Dra. Maria Teresa Bordalo Santos Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro Dr. António Luciano Costa  <b>Parecer:</b> Apreciado o projeto do estudo, foi decidido por unanimidade dos votantes emitir parecer favorável à sua realização.  Este parecer não dispensa eventuais requisitos ou procedimentos por parte do Responsável pelo Acesso à Informação (RAI) ou do Encarregado de Proteção de Dados (EPD) desta instituição, no âmbito do previsto no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados (RGPD) ou noutra legislação aplicável quanto a acesso, tratamento e proteção de dados.  A realização do estudo carece da necessária autorização por parte do Exmo. Conselho de Administração do CHUCB e no seu decurso pode ser sujeito a auditorias.  O Presidente da Comissão de Ética do CHUCB   (Prof. Doutor Manuel Passos Morgado)



## 7.2. Anexo II – Autorização do Conselho de Administração do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira



Considerando, no âmbito do estudo nº 67/2023 “Análise da Taxa de Falsos Positivos e Falsos Negativos dos Testes Pré-natais Não Invasivos (NIPT/Cell-free DNA) realizados em grávidas seguidas no Serviço de Obstetrícia do CHUCB”:

- Existe todo um processo adjacente a este pedido, que deu entrada no Serviço de Investigação, Epidemiologia e Saúde Pública – Gabinete de Investigação e Inovação, e que obteve os pareceres favoráveis do Coordenador deste Gabinete, do Diretor de Serviço envolvido e da respetiva Comissão de Ética, nos termos da Lei da Investigação Clínica (Lei 21/2014) e do Regulamento e Procedimentos deste Centro de Investigação;
- Os intervenientes no processo estão abrangidos pelo sigilo profissional ou assinaram declaração de confidencialidade;
- Os intervenientes no processo comprometem-se a destruir os dados recolhidos após a conclusão do estudo;
- O interesse público revelado pelo presente estudo.

Assim, verificadas as condições acima descritas e não obstante a impossibilidade de anonimização / pseudoanonimização dos dados autoriza-se, solicitando-se a **Gabinete Planeamento e Controlo de Gestão** que disponibilize a lista de todas as mulheres seguidas no Serviço de Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira que efetuaram teste pré-natal não invasivo (NIPT/Cell-Free DNA) entre fevereiro de 2016 e junho de 2024, à Dra Nélia Rodrigues, médica a exercer na ULSCBeira.

Data: 15/01/2024

EPD

RAI



Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira  
Hospital Pêro da Covilhã | Alameda Pêro da Covilhã, 6200-251 Covilhã, PORTUGAL | TEL + 351 275 33 00 00 FAX + 351 275 33 00 01  
Hospital do Fundão | Av. Adolfo Portela, 6230-288 Fundão, PORTUGAL | TEL + 351 275 33 00 00 FAX + 351 275 751 257  
E-MAIL [administracao@chbeira.min-saude.pt](mailto:administracao@chbeira.min-saude.pt) [www.chbeira.min-saude.pt](http://www.chbeira.min-saude.pt)

1/2