

A eficácia do teste pré-natal não invasivo (NIPT Cell-free DNA): A experiência do CHUCB

(Versão final após defesa)

Ana Filipa da Silva Clemente

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientadora: Dra. Nélia Lamberta Pereira Rodrigues
Co-orientadora: Dra. Fernanda Taliberti Pereto Meyer

Julho de 2022



ANEXO

Declaração de Integridade

Eu, Ana Filipa da Silva Clemente, que abaixo assino, estudante com número de inscrição 36942 do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridade da Universidade da Beira Interior**.

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

Universidade da Beira Interior, Covilhã 14/07/2022

Dedicatória

A quem reavivou em mim este sonho
e me deu coragem para acreditar e trilhar novos caminhos

Agradecimentos

É com muita dedicação e orgulho que concluo esta etapa, a qual não seria possível sem o apoio e incentivo daqueles que me acompanharam. A todos, os meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Nélia Rodrigues, minha orientadora, pela confiança que depositou em mim, por todo o tempo que dispensou para me ajudar, assim como pelo interesse, dedicação e disponibilidade constante com que se envolveu nesta investigação.

À Dra. Fernanda Meyer, que aceitou coorientar esta dissertação, e cujos conselhos e conhecimentos contribuíram para a sua elaboração e enriquecimento, a quem agradeço todo o apoio e espírito crítico construtivo que ofereceu.

À Doutora Ana Barreto, pela prontidão e ajuda indispensável na análise estatística.

A todo o serviço e equipa de Ginecologia e Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, pelo simpático acolhimento e disponibilidade para ajudar.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e a todos os que contribuíram para a minha formação, por estes 6 anos de aprendizagem e por me terem oferecido a oportunidade de estudar o que me realiza e de exercer Medicina.

Aos meus pais, por serem os meus pilares e me darem força para me superar a mim mesma. Pela fé e orgulho que depositam em mim e no percurso que vou construindo. Por todo o esforço, amor e apoio incondicional com que me ensinaram a perseverar e a ser resiliente.

À minha irmã, pela cumplicidade, por me encorajar e desafiar a fazer mais e melhor, por me lembrar da menina que queria ser médica e me empurrar na direção dos meus sonhos.

Ao João, pelo enorme apoio, companheirismo e força que me deu ao longo desta jornada.

Ao Tiago, Marco e Fernando, por serem os melhores companheiros de estágio que poderia ter. Pela amizade, aventuras e bons momentos que partilhamos.

À Beatriz, Joana e Cristiana, pelas vivências que jamais esquecerei, pela amizade e interajuda, por fazerem da Covilhã uma casa longe de casa e se tornarem a minha família na medicina.

A todos os amigos, por quem sinto o maior orgulho ao assistir às vossas vitórias, de vos ver atingir os vossos objetivos e crescerem para serem os brilhantes profissionais em que tenho a certeza que se tornarão.

Muito obrigada!

Resumo

Introdução: O rastreio combinado do primeiro trimestre atualmente em vigor resulta num elevado número de falsos positivos que, conseqüentemente, são sujeitos a testes invasivos para determinação do cariótipo fetal, com os respetivos riscos implícitos a estas técnicas. O teste pré-natal não invasivo por análise de ADN livre fetal (NIPT) trouxe, pela primeira vez nas técnicas de diagnóstico pré-natal, a oportunidade de conhecer o genoma fetal através de um procedimento não invasivo, permitindo uma deteção mais fidedigna de patologias genéticas do feto. No entanto, em Portugal, a Direção-Geral de Saúde não o contempla ainda nas normas de rastreio pré-natal.

Objetivos: O presente estudo pretende verificar se o NIPT poderia substituir com segurança o rastreio combinado do primeiro trimestre atualmente utilizado, sem comprometer o diagnóstico de cromossomopatias, ou se traz mais vantagens enquanto teste de segunda linha nos casos de rastreio combinado positivo. Propõe-se também a determinar o impacto que a sua adoção poderá ter no número de procedimentos diagnósticos invasivos necessários.

Métodos: Neste estudo observacional transversal retrospectivo, foram incluídas todas as grávidas que realizaram, além do rastreio combinado do primeiro trimestre, um teste pré-natal não invasivo por análise de ADN livre fetal no decurso do acompanhamento da sua gestação no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira desde fevereiro de 2016 até março de 2022. A determinação da presença de anomalia cromossómica foi feita usando como *gold-standard* o cariótipo ou, em alternativa, o estudo do fenótipo do recém-nascido no exame físico à nascença. Foi analisado o desempenho do rastreio combinado e do NIPT na amostra, recorrendo-se a análise descritiva e análise estatística com o teste qui-quadrado, teste de Fisher, teste de McNemar e curvas ROC.

Resultados: Entre as 197 gestações existiram 4 casos de aneuploidia. O NIPT foi capaz de detetar 3 delas, sendo a restante uma alteração não identificável através de NIPT (triploidia 69,XXX). Comparando o uso do NIPT como rastreio de primeira linha com a sua adoção em segunda linha, após os casos identificados pelo rastreio combinado como sendo de risco elevado e intermédio, obteve-se respetivamente: especificidade de 98.45% e 100%, falsos positivos de 1.52% e 0, valor preditivo positivo 50% e 100%, e valor preditivo negativo de 100% em ambas as situações. Se usado como primeira linha, comparativamente ao rastreio atual, o NIPT reduziria os testes invasivos necessários em 57.14%. Se usado em segunda linha, seria possível uma redução de 92.86% das amniocenteses.

Conclusão: O NIPT apresentaria mais vantagens se fosse introduzido como rastreio de segunda linha perante um rastreio combinado do primeiro trimestre positivo. Esta opção não comprometeria a deteção de aneuploidias e, simultaneamente, permitiria diminuir o número de testes invasivos necessários de forma significativa.

Palavras-chave

Rastreio pré-natal; Diagnóstico pré-natal; Teste pré-natal não invasivo; ADN livre fetal; Cromossomopatias.

Abstract

Introduction: The first trimester combined screening currently in place results in a high number of false positives that consequently undergo invasive tests for fetal karyotyping, with the respective risks implicit in these techniques. The non-invasive prenatal testing by cell-free fetal DNA analysis (NIPT) has brought, for the first time in prenatal diagnosis, the opportunity to know the fetal genome through a non-invasive procedure, allowing a more reliable detection of genetic pathologies of the fetus. However, in Portugal, the Directorate-General for Health doesn't include it yet in the norms for prenatal screening.

Objectives: This study aims to investigate if the NIPT could safely replace the first trimester combined screening currently in use, without compromising the diagnosis of chromosomal defects, or whether it has more advantages as a second-line test in cases of positive combined screening. It is also intended to determine the impact that its adoption may have on the number of invasive diagnostic procedures required.

Methods: This retrospective cross-sectional observational study includes all pregnant women who performed, in addition to the first trimester combined screening, a non-invasive prenatal test by cell-free fetal DNA during the follow-up of their pregnancy at the Cova da Beira University Hospital Center since February 2016 until March 2022. The determination of the presence of chromosomal abnormality was made using as gold-standard the karyotype or, alternatively, the study of the newborn's phenotype in the physical examination at birth. The performance of the combined screening and NIPT in the sample was analyzed using descriptive and statistical analysis with the chi-square test, Fisher's test, McNemar's test, and ROC curves.

Results: Among the 197 pregnancies there were 4 cases of aneuploidy. NIPT was able to detect 3 of them, the remaining one being a disorder not identifiable through NIPT (triploidy 69,XXX). Comparing the use of the NIPT as a first-line screening with its adoption as a second-line after the cases identified as high and intermediate risk by the combined screening, we obtained respectively: specificity of 98.45% and 100%, false positives of 1.52% and 0, positive predictive value of 50% and 100%, and negative predictive value of 100% in both situations. If used as first-line, compared to the current screening, the NIPT would reduce the invasive tests needed by 57.14%. If used as a second-line, a 92.86% reduction in amniocentesis would be possible.

Conclusion: NIPT would have more advantages if it were introduced as a second-line screening after a positive first trimester combined screening. This option would not compromise the detection of aneuploidies and would at the same time significantly decrease the number of invasive tests needed.

Keywords

Prenatal screening; Prenatal diagnosis; Non-invasive prenatal testing; Fetal cell-free DNA; Chromosomal abnormalities.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento teórico	1
1.2 Objetivos do estudo	10
2. Métodos	13
2.1 Tipo de Estudo	13
2.2 População em Estudo	13
2.3 Recolha de Dados	14
2.4 Descrição das Variáveis	15
2.4.1 Variável Dependente	15
2.4.2 Variáveis Independentes	15
2.5 Protocolo do estudo	16
2.6 Análise Estatística	17
2.7 Considerações Éticas	17
3. Resultados	19
3.1 Caracterização sociodemográfica da amostra	19
3.2 Testes NIPT utilizados	20
3.3 Resultados discordantes e indeterminados do NIPT	21
3.3.1. Associação com características maternas e da gestação	22
3.4 Comparação entre os métodos de rastreio	24
3.4.1. Comparação dos resultados do RCPT com o cariótipo/ fenótipo à nascença	24
3.4.2. Comparação dos resultados do NIPT com o cariótipo/ fenótipo à nascença	27
3.4.3. Comparação do desempenho do NIPT e do RCPT	29
3.5 Impacto do uso de NIPT no número de procedimentos invasivos	30
3.5.1. Gestações da amostra com critério para amniocentese	30
3.5.2. Amniocenteses realizadas na amostra	31
3.5.3. Impacto do NIPT no número de testes invasivos necessários	32
3.6 Efeitos adversos de amniocenteses realizadas no CHUCB	34

3.7 IMG realizadas após diagnóstico de patologia genética fetal	34
4. Discussão	35
5. Conclusão	41
5.1 Limitações do estudo	41
5.2 Linhas futuras de investigação	42
6. Referências Bibliográficas	43
7. Anexos	49
7.1 ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira	49
7.2 ANEXO II – Autorização do Conselho de Administração do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira	50

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma de seleção da amostra	14
Figura 2: Resultados obtidos pelo RCPT.....	25
Figura 3: Curva ROC para RCPT na detecção de aneuploidias	26
Figura 4: Resultados obtidos pelo NIPT	27
Figura 5: Curva ROC para NIPT na detecção de aneuploidias	29
Figura 6: Gestações da amostra com critério para amniocentese.....	31
Figura 7: Amniocenteses realizadas na amostra	32
Figura 8: Testes diagnósticos invasivos necessários se o NIPT fosse o rastreio de primeira linha.....	33
Figura 9: Testes diagnósticos invasivos necessários se o NIPT fosse rastreio de segunda linha, após RCPT positivo	33

Lista de Tabelas

Tabela 1: Caracterização sociodemográfica e das gestações da amostra	20
Tabela 2: Caracterização dos testes NIPT utilizados	21
Tabela 3: Associação entre resultados obtidos por NIPT e características maternas e da gestação	23
Tabela 4: Descrição dos resultados indeterminados obtidos por NIPT	23
Tabela 5: Desempenho do RCPT na detecção de aneuploidias	26
Tabela 6: Desempenho do NIPT na detecção de aneuploidias	28
Tabela 7: Comparação do desempenho do RCPT com o NIPT na detecção de aneuploidias	30

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AUC	<i>Area Under the Curve</i> / Área por baixo da curva
β -hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana β
BVC	Biópsia de Vilosidades Coriónicas
cffDNA	<i>Cell-free Fetal DNA</i> / ADN livre fetal
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
CI	<i>Confidence Interval</i> / Intervalo de Confiança
CSS	<i>Chromosome Selective Sequencing</i> / Sequenciação Seletiva de Cromossomas
DP	Desvio-padrão
DPN	Diagnóstico Pré-Natal
FF	Fração Fetal
FN	Falsos Negativos
FP	Falsos Positivos
IMC	Índice de Massa Corporal
IMG	Interrupção Médica da Gravidez
ISUOG	<i>International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology</i>
Mdn	Mediana
MPS	<i>Massively Parallel Sequencing</i> / Sequenciação Paralela Massiva
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> / Sequenciação de Nova Geração
NIPT	<i>Non-invasive Prenatal Testing</i> / Teste Pré-natal Não Invasivo
PAPP-A	Proteína Plasmática A Associada à Gravidez
PMA	Procriação Medicamente Assistida
RCPT	Rastreio Combinado do Primeiro Trimestre
Rh	Rhesus
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> / Curva Característica de Operação do Recetor
SG	Semanas de Gestação
s-MPS	<i>Shotgun Massively Parallel Sequencing</i> / Sequenciação Paralela Massiva Shotgun
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorfism</i> / Análise de Polimorfismos de Nucleótido Único
SNS	Sistema Nacional de Saúde

SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T13	Trissomia 13 ou Síndrome de Patau
T18	Trissomia 18 ou Síndrome de Edward
T21	Trissomia 21 ou Síndrome de Down
t-MPS	<i>Targeted Massively Parallel Sequencing</i> / Sequenciação Paralela Massiva Seletiva
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> / Sequenciação de Todo o Genoma

1. Introdução

1.1 Enquadramento teórico

De acordo com o relatório mais recente do Registo Nacional de Anomalias Congénitas, em Portugal nasceram cerca de 34 crianças com anomalias cromossómicas por cada 10 mil nascimentos entre 2018 e 2019, sendo a Síndrome de Down ou Trissomia 21 (T21) a etiologia mais prevalente com mais de 19 casos por cada 10 mil, seguida da Síndrome de Edwards ou Trissomia 18 (T18) e Síndrome de Patau ou Trissomia 13 (T13) que em conjunto representam quase 7 casos por cada 10 mil. Estas anomalias cromossómicas são as três principais aneuploidias autossómicas viáveis.¹

Atualmente, é possível identificar ainda durante a gestação se o feto é portador de uma anomalia congénita através do diagnóstico pré-natal (DPN).² Possibilitando um diagnóstico atempado, o DPN permite oferecer aos pais a oportunidade de decidirem o futuro da gravidez. Este pode incluir uma interrupção médica da gravidez (IMG) ou o planeamento e preparação psicológica, social, financeira e médica para os cuidados que possam ser necessários para uma criança com anomalias cromossómicas, cujas consequências podem variar entre a incompatibilidade com a vida até severas incapacidades físicas ou intelectuais.^{3,4} Através do DPN, entre 2018 e 2019, foi possível detetar 93.4% dos casos de anomalias cromossómicas na fase pré-natal, incluindo 91.2% das T21 e 100% das T18 e T13. Destes, 60.6%, 62.8% e 71.9% dos casos de cada aneuploidia, respetivamente, foram detetados no primeiro trimestre da gestação. No total, apenas 18.4% das gestações afetadas por anomalias cromossómicas culminaram no nascimento de uma criança viva, tendo os progenitores optado por uma IMG em 80.8% dos casos.¹

Para este efeito, o Sistema Nacional de Saúde (SNS) tem em vigor o Programa Nacional para a Vigilância da Gravidez de Baixo Risco, que disponibiliza o rastreio combinado do primeiro trimestre (RCPT) entre as 11 e as 13+6 semanas de gestação (SG). O RCPT implica um rastreio bioquímico através da determinação sanguínea materna da fração livre da Gonadotrofina Coriónica Humana β (β -hCG) e da Proteína Plasmática A associada à gravidez (PAPP-A), às quais se combinam a idade materna e marcadores ecográficos, nomeadamente a translucência nucal.⁵⁻⁷

A β -hCG e a PAPP-A são marcadores bioquímicos produzidos pelos trofoblastos da placenta e a sua quantidade varia ao longo da gestação, conforme o desenvolvimento placentário. Não tendo em consideração a idade materna, estes valores analíticos têm uma sensibilidade de 64%, com uma especificidade de 95% e uma taxa de falsos positivos (FP) de 5% na deteção de T21. Quando relacionado com a idade materna, o rastreio bioquímico

tem uma capacidade de detecção de 68% no caso de T21, mantendo a especificidade e FP.⁸ Adicionando os marcadores ecográficos, o RCPT consegue detetar 87% dos casos de T21, mantendo no entanto os 5% FP.⁹ No aconselhamento pré-natal, as grávidas devem ser alertadas para esta elevada taxa de FP já que, neste caso, é indicada a confirmação através de procedimentos diagnósticos invasivos, o que contribui para a ansiedade materna.^{10,11}

Sendo aceite e comumente utilizado como método para rastreio de aneuploidias, o RCPT não permite determinar se o feto tem efetivamente uma anomalia cromossómica, oferecendo apenas uma estratificação de risco. Por este motivo, é aconselhado realizar um teste invasivo para diagnóstico definitivo perante um RCPT que indique risco elevado. No entanto, dado o elevado número de FP, uma em cada 20 mulheres com RCPT de risco elevado é sujeita a testes invasivos que vêm a demonstrar a ausência de patologia cromossómica fetal.^{7,8,11}

Entre os possíveis testes invasivos diagnósticos, a biópsia de vilosidades coriônicas (BVC) é o que pode ser oferecido mais precocemente na gravidez, com as diretrizes a recomendar que seja efetuada após as 10+0SG.^{12,13} Quando realizada antes deste prazo existe a possível associação com transtornos oromandibulares e dos membros, além da acrescida dificuldade na sua execução pelo acesso e tecido placentário mais fino e menos desenvolvido.¹³ Este procedimento consiste numa técnica transabdominal ou transcervical para recolha e posterior análise de células trofoblásticas da placenta, pelo que o seu resultado pode ser afetado por mosaicismo placentário em 1–2% dos casos.^{12–14}

Outra opção de teste diagnóstico invasivo é a amniocentese, que permite a colheita de uma amostra de líquido amniótico e pode ser realizada após as 15+0SG.^{12,13} A sua execução antes deste prazo aumenta o risco de perda fetal e de *talipes equinovarus*, ou pé boto.^{13,14}

Existe ainda a cordocentese que consiste na colheita de sangue do cordão umbilical e pode ser realizada após as 18+0SG para investigação de mosaicismo, diagnóstico fetal e transfusões fetais intrauterinas. Contudo, este procedimento é cada vez menos utilizado, tendo sido substituído pela BVC e amniocentese por poderem ser realizadas mais precocemente e terem menor risco de perda fetal, comparativamente.^{12,15}

Estes procedimentos invasivos permitem identificar alterações cromossómicas numéricas (aneuploidias) e estruturais (translocações, inversões, e grandes duplicações e deleções) através do estudo do genoma fetal, considerado atualmente como o *gold-standard* das opções diagnósticas pré-natais. No entanto, estas técnicas acarretam riscos, entre os quais: infeção, sépsis, rotura prematura de membranas e aborto espontâneo.¹³ Estudos demonstram que a amniocentese tem um risco de aborto de 0.11%, correspondendo a 1 caso por cada 909 procedimentos, e a BVC de 0.22% ou 1 caso por cada 455.¹⁶ No caso de gravidez múltipla, o risco aumenta para a perda de 1 feto por cada 100 procedimentos (1%).¹³ Este risco é, no entanto, dependente da experiência do profissional

que realiza a técnica, sendo estes valores correspondentes a centros especializados com profissionais altamente treinados.^{12,13,16} No geral, o risco de perda fetal em ambos os procedimentos pode chegar a 1%, equivalendo a 1 mulher em cada 100 sofrer um aborto espontâneo em consequência de um teste invasivo.¹⁵

Como o RCPT que indique risco elevado instiga à realização de um teste invasivo, e sabendo que os testes invasivos estão associados à possibilidade de perda fetal, a elevada taxa de FP dos testes de rastreio atualmente utilizados contribui para o potencial aborto de um feto sem anomalias genéticas.⁷

Este risco inerente aos procedimentos invasivos incitou o desenvolvimento de novos procedimentos de rastreio e de diagnóstico.¹¹ Sabendo que os procedimentos diagnósticos pré-natais que implicam uma técnica invasiva apenas devem ser realizados quando existe uma grande probabilidade de se detetar uma anomalia congénita grave, urge procurar novos métodos que permitam aferir com maior eficácia esta probabilidade, com menores taxas de FP do que o atual RCPT.² Neste sentido, surge o teste pré-natal não invasivo (NIPT) por análise de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) livre fetal (cffDNA).

A presença de cffDNA na circulação sanguínea materna foi demonstrada pela primeira vez em 1997 por Lo et al.¹⁷ Desde então, desenvolveram-se técnicas com base neste conhecimento que permitiram a introdução clínica do NIPT para rastreio de aneuploidias fetais em 2011. Atualmente o NIPT está já difundido e é amplamente utilizado em mais de 60 países nos 6 continentes.^{18,19}

O cffDNA origina-se da apoptose fisiológica de trofoblastos da placenta com pequenos fragmentos de ADN inferiores a 200–300 pares de base que são continuamente libertados e passam para a circulação sanguínea materna.^{11,20} Designa-se de fração fetal (FF) à percentagem de ADN livre de origem placentária que circula no plasma materno.²¹ A FF varia ao longo da gestação entre os 2 e os 20% do ADN livre total, sendo possível detetar cffDNA desde as 5SG até ao final da gravidez.¹¹ Após as 10SG, mais de 10% do ADN livre no plasma da grávida é de origem placentária.²⁰ Sabe-se ainda que o cffDNA desaparece da circulação materna pouco tempo após o parto, não coexistindo por isso em futuras gravidezes.²²

Tal como os testes invasivos, o NIPT permite a obtenção de células nucleadas fetais e, por conseguinte, possibilita a sua análise cromossómica. No entanto, por ser um teste que implica apenas a colheita de uma amostra de sangue venoso materno, não existe risco de perda fetal associado, ao contrário dos testes invasivos. O NIPT é também o teste que mais precocemente pode ser oferecido, permitindo um rastreio mais atempado do que o atualmente utilizado.²³ Por este motivo, permite tranquilizar mais cedo a maioria das grávidas acerca da ausência de patologia genética no seu feto, e possibilita um planeamento e possível IMG mais cedo e com maior segurança àquelas cujo feto sofre de aneuploidia.^{10,24}

A análise de cfDNA pode ser realizada com recurso a diferentes tecnologias e métodos de sequenciação de nova geração (NGS) ou sequenciação paralela massiva (MPS). Atualmente os métodos utilizados são: sequenciação *shotgun* de todo o genoma (s-MPS), sequenciação seletiva (t-MPS) por sequenciação seletiva de cromossomas (CSS), ou análise de polimorfismos de nucleótido único (SNP).^{21,25} Existem também tecnologias que já permitem fazer análise do ADN por microarray ou sequenciação de todo o genoma (WGS), oferecendo uma visão mais abrangente do genoma fetal, possivelmente o futuro do NIPT.²⁵

Ao analisar o ADN livre do sangue materno por NGS são geradas sequências de ADN de origem materna e fetal em proporções relativas à sua abundância na amostra, tornando possível verificar se há excesso ou perda de material genético fetal e consequentemente detetar os casos com risco de aneuploidia.^{11,20} A s-MPS gera leituras de sequências das regiões informativas de todos os cromossomas e é capaz de detetar alterações como microdeleções e patologias monogénicas, tornando promissor um possível aumento da oferta de patologias identificáveis. Pelo contrário, a t-MPS por CSS amplifica e sequencia seletivamente regiões de interesse de cromossomas específicos, pelo que, embora seja mais custo-efetiva comparativamente à s-MPS, apenas permite a deteção de um número limitado de desequilíbrios cromossómicos. A SNP é um método qualitativo comparativamente aos anteriores, que são quantitativos, e permite identificar contribuições específicas maternas e fetais nas sequências lidas, possibilitando reconstruir haplótipos e identificar alterações como triploidias, microdeleções e dissomias uniparentais.^{26,27} Estes métodos oferecem uma eficácia semelhante na deteção das três trissomias mais prevalentes embora, por dependerem da proporção de ADN fetal em comparação com o ADN materno, a sua capacidade de deteção de alterações genéticas dependa da FF presente na amostra.^{11,25,28}

A FF é afetada por vários fatores que, além de influenciarem o resultado obtido pelo NIPT, podem conduzir a falsos negativos (FN) ou falsos positivos e até mesmo impossibilitar a obtenção de um resultado.²⁹ Assim, o NIPT pode apresentar resultados falsos positivos, falsos negativos e indeterminados, quer devido a erros técnicos como a fatores biológicos. Estes fatores biológicos podem, por sua vez, ser de origem materna ou fetal.³⁰

A causa mais comum para que não seja possível obter um resultado é uma FF insuficiente, geralmente inferior a 4%, motivo pelo qual se aconselha que a amostra de sangue materno para NIPT seja obtida após as 10SG.^{10,21,24,30}

Entre os vários fatores que afetam a FF e aumentam a probabilidade de falha na obtenção de um resultado por NIPT, sabe-se que: o peso materno aumenta o risco em 5% por cada quilograma acrescido e a idade materna aumenta o risco em 2% por cada ano adicional. As raças africana e sul asiática têm uma maior proporção de ADN livre materno comparativamente à raça caucasiana, pelo que aumentam o risco em 2.0 e 1.7 vezes,

respetivamente. Por sua vez, a fertilização *in vitro* aumenta o risco 3.8 vezes, e uma gravidez gemelar bicoriónica aumenta o risco em 1.7 vezes. Da mesma forma, por estarem relacionados com uma menor massa placentária e, portanto, uma menor FF, o risco de falha aumenta quanto mais reduzida for a idade gestacional, a PAPP-A e a β -hCG. Alguns dos fatores fetais que também podem ter influência são o mosaicismo fetoplacentário e o fenómeno de *vanishing twin*.²⁹⁻³⁴

Abordando algumas das características maternas, sabe-se que no caso de obesidade materna a proporção de FF diminui com o aumento do peso e IMC (Índice de Massa Corporal) da grávida. Esta redução pode ser atribuída a um efeito dilucional, mas deve-se considerar também o facto de que o ADN livre materno aumenta devido à intensificação da remodelação e *turnover* de adipócitos.^{29-31,33,35}

Patologias autoimunes maternas também podem afetar o resultado do NIPT já que, em consequência das reações inflamatórias, o ADN livre materno aumenta em proporção ao fetal, traduzindo-se numa menor FF.³⁰

O uso de heparina, por reduzir o tamanho dos fragmentos de ADN livre fetal, tem também o potencial para interferir com o resultado do NIPT, sendo aconselhado fazer a colheita da amostra de sangue quando a concentração sérica de heparina estiver no seu pico mínimo.³⁰

O tabaco é outro fator que influencia o NIPT. Se por um lado afeta o desenvolvimento da placenta e diminui a sua massa, levando a uma diminuição da FF, por outro lado esta diminuição é compensada pelo aumento da necrose de trofoblastos, pelo que a fração materna acaba por estar mais diminuída do que a fetal.^{31,33}

Paralelamente, embora não esteja relacionado com a FF, é relevante considerar que nos casos em que a gestante tenha recebido um transplante (de medula, órgão ou produtos sanguíneos) de um dador masculino, o NIPT pode gerar um resultado discordante relativamente ao sexo fetal pela presença de ADN livre do dador na circulação materna. No caso de transfusão sanguínea, sabe-se que é possível que a identificação do sexo fetal seja incorreta nas quatro semanas seguintes.^{10,30}

É necessário ter também em conta que na interpretação do NIPT assume-se que a grávida tem um cariótipo normal, o que pode não ser verdade, conduzindo a um resultado falso positivo.³⁰ Embora não seja este o propósito do NIPT, importa salientar que este teste potencialmente poderá revelar informação genómica materna, levantando suspeitas de neoplasias ocultas.¹⁰

No que concerne a características fetais ou da gestação que afetam a FF, é conhecida a influência das principais aneuploidias na FF. Sabe-se que a FF diminui nos casos de T18 e T13, em consequência da menor dimensão placentar, mas aumenta na T21. Por este

motivo, no caso de falha na obtenção de resultado, pode-se considerar que exista um maior risco de T18 e T13, mas não de T21.²⁸⁻³¹

Comparativamente a gestações por concepção espontânea, as que são conseguidas com recurso a técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) apresentam uma FF diminuída, o que aumenta o risco de que sejam obtidos resultados indeterminados.³⁶

No caso de gravidez múltipla, se ambos os fetos forem euploides, a FF é superior à encontrada nos casos de gravidez única. Não existe diferença na FF entre gravidezes monocoriônicas e bicoriônicas, embora nas bicoriônicas pela presença de um terceiro genoma na análise (o materno e os dois fetais), e dada a variabilidade na contribuição de cada feto para a FF encontrada na circulação materna, o resultado do NIPT pode ser erróneo.^{11,37} O NIPT demonstra ter nas gestações múltiplas uma performance para deteção de T21 sobreponível à obtida em gravidezes únicas. No entanto, os estudos existentes não permitem concluir acerca da sua utilização para deteção de T18 e T13 dada a baixa prevalência destas nas amostras.³⁷

A situação particular de *vanishing twins*, pode associar-se com resultados falsos positivos já que, em cerca de 50% dos casos, a morte fetal é devida a aneuploidias cromossómicas. A placenta do feto afetado pode libertar cffDNA díspar do feto sobrevivente durante várias semanas e influenciar o resultado do NIPT.³⁰

Tendo em conta que a origem do cffDNA são os trofoblastos da placenta, o resultado do NIPT reflete o genoma desta, podendo não ser condizente com o do feto em casos de mosaicismo fetal ou placentar. Na presença de mosaicismo, o NIPT pode apresentar um resultado falso negativo quando o feto tem uma alteração cromossómica e a placenta apresenta um cariótipo normal ou uma proporção superior de células normais comparativamente às afetadas, e a situação inversa pode originar falsos positivos. Estes casos acontecem com mais frequência na T13, seguida da T18, mas são raros em T21.³⁰

Apesar da existência destas condicionantes na FF, a análise de cffDNA permite atualmente identificar várias aneuploidias, translocações, microdeleções e microduplicações que anteriormente eram apenas detetáveis através de testes invasivos.¹⁰

Na prática clínica, o NIPT é cada vez mais utilizado para rastreio de T21, T18 e T13. Quando consideramos gravidezes únicas independentemente do risco prévio para aneuploidias, o NIPT consegue atingir uma sensibilidade de 99.4% para T21, 97.7% para T18 e 90.6% para T13, com especificidades de 99.9% para as primeiras duas e de 100% para T13.³⁸ Se tivermos em conta apenas gestações de alto risco, este teste consegue uma sensibilidade de 99.8% na deteção de T21, 97.7% para T18 e 97.5% para T13, com 99.9% de especificidade para as três trissomias.¹⁸ Assim, o NIPT apresenta um desempenho superior ao do RCPT no rastreio destas trissomias quando comparando a sua sensibilidade e especificidade, com menos casos falsos positivos.^{4,11,28}

O NIPT permite também rastrear aneuploidias dos cromossomas sexuais como Síndrome de Turner (45,X), Síndrome de Klinefelter (47,XXY), Síndrome de Triplo X (47,XXX) e Síndrome de Jacobs (47,XYY).^{4,11} Não havendo atualmente outros métodos para rastreio de aneuploidias dos cromossomas sexuais, a procura de NIPT para identificação destas condições tem sido crescente.¹⁰ Para a identificação de Síndrome de Turner, o NIPT consegue uma taxa de diagnóstico de 95.8% com 0.14% FP. Para as restantes aneuploidias dos cromossomas sexuais, as taxas de diagnóstico são frequentemente sobrevalorizadas por não ser comum a realização de diagnóstico por cariótipo.²⁸

Relativamente à deleção 22q11.2 (Síndrome DiGeorge) e microdeleções 1p36, 5p- (Síndrome Cri-du-chat) e 15q- (Síndrome Prader-Willi/ Angelman), o NIPT tem um valor preditivo positivo de 44.2% para a 22q11.2 e 31.7% para as restantes. A taxa de falsos positivos para a 22q11.2 é de 0.07% e a das remanescentes quatro combinadas é também de 0.07%.³⁹ O valor preditivo positivo do NIPT para as microdeleções é inferior ao da T18 e T21, mas semelhante ao obtido para a T13 e Síndrome de Turner. Ainda assim, os seus valores preditivos positivos são superiores aos observados com o RCPT, que é atualmente considerado aceitável para ser utilizado como exame de rastreio de primeira linha.³⁹

Além do rastreio de cromossomopatias, o NIPT oferece também a possibilidade de conhecer o Rhesus-D (RhD) fetal ainda *in útero*. Sabe-se que em mulheres RhD negativo grávidas de fetos RhD positivo, a presença de antigénio RhD na circulação materna estimula a produção de anticorpos anti-D. Esta isoimunização pode acontecer em qualquer momento durante a gravidez, sendo mais comum no 3º trimestre e durante o parto, e conduz a anemia hemolítica fetal. O risco aumenta nas gravidezes subsequentes com fetos novamente RhD positivos. Por este motivo, grávidas RhD negativo recebem profilaxia com imunoglobulina anti-D.^{40,41}

A identificação do RhD fetal permite reduzir os casos em que é utilizada a profilaxia anti-RhD, limitando o seu uso às situações em que o feto é RhD positivo. Através do NIPT é possível conhecer o RhD fetal com uma sensibilidade de 99% e especificidade de 98%, 1.3% de FP e 2% de FN, possibilitando uma redução substancial da administração de imunoglobulina anti-D nos casos em que esta é desnecessária, com um aumento discreto no número de casos de sensibilização devido aos FN.⁴⁰ Em alguns países como a Dinamarca e Países Baixos, o NIPT é já utilizado para este fim em substituição de testes pós-natais.⁴²

Embora se verifiquem todas estas vantagens, todos os NIPT positivos para aneuploidias devem ser confirmados com um teste diagnóstico invasivo, tendo em conta que podemos estar na presença de um caso de mosaicismo sem patologia fetal, por exemplo. A escolha depende da idade gestacional e da frequência de mosaicismo placentário para a patologia em questão.²¹

Por este motivo, nos casos de NIPT positivo para T13 é recomendado realizar uma ecografia ainda no primeiro trimestre. Se forem identificadas anomalias na ecografia, então deverá ser proposta uma BVC. Na ausência de anomalias ecográficas, embora possa ser oferecida uma BVC, é importante realçar que pela elevada frequência de mosaicismo confinado à placenta poderá ser necessária a realização de amniocentese para confirmação. Nas situações de NIPT positivo para T18 ou T21, por o mosaicismo placentar não ser tão comum, poderá ser proposta a BVC como procedimento diagnóstico.⁴³

Quando o NIPT é positivo para Síndrome de Turner, deve-se verificar se existem concomitantemente alterações ecográficas. Caso sejam detetadas características compatíveis, como a translucência da nuca aumentada ou higroma cístico, a BVC é recomendada. Se a ecografia não revelar alterações, poderá ser proposto um cariótipo à grávida para avaliar se existe mosaicismo materno. No entanto, deve ser salientado que um cariótipo materno anormal não exclui que o feto também possa ter a patologia, pela possibilidade de existir mosaicismo materno.⁴³

Se o NIPT for positivo para trissomias autossómicas incompatíveis com a vida, deve ser tido em consideração que apenas casos de mosaicismo fetal sobrevivem, pelo que uma BVC mostraria mosaicismo e seria necessário realizar amniocentese para confirmar se o mosaicismo é placentário ou fetal. Caso o feto não tenha alterações no exame ecográfico, 97% serão casos de mosaicismo confinado à placenta. Por este motivo, se a ecografia for normal, é preferível aconselhar amniocentese.⁴³

Um NIPT positivo para várias aneuploidias em que a amniocentese exclua diagnóstico fetal poderá refletir uma situação de malignidade materna. Nestes casos dever-se-á realizar uma história clínica completa, exame físico e considerar propor exames analíticos e de imagem para excluir possíveis neoplasias.⁴³

Dada a performance superior e os benefícios do NIPT, tem-se considerado que este possa vir a substituir o RCPT como teste de rastreio de primeira linha. Esta opção permitiria uma maior deteção dos casos de aneuploidias e, pelo menor número de falsos positivos e falsos negativos, eliminaria a falsa segurança dada pelo método atual e permitiria reduzir o número de testes invasivos necessários.^{18,44-46}

Outra possível abordagem seria introduzir o NIPT como teste de segunda linha, como sequencial ou contingente ao resultado do RCPT atualmente aplicado. Como teste sequencial, o NIPT seria oferecido a todas as mulheres cujo rastreio fosse de risco elevado e intermédio. Assim, em vez do próximo passo após um RCPT de risco ser a realização de um teste invasivo, seria oferecida a possibilidade de realizar um NIPT primeiro. Neste caso, apenas haveria indicação para teste invasivo se o NIPT indicasse alta probabilidade de cromossomopatia. Num modelo contingente, mantém-se a indicação para teste invasivo se o rastreio for de risco elevado, mas oferecer-se-ia o NIPT para as gestações de risco

intermédio, que por sua vez apenas efetuariam um teste invasivo se o NIPT sugerisse cromossomopatias. Estas alternativas permitiriam evitar de forma significativa um teste invasivo na população de falsos positivos que realizam o RCPT atualmente.^{11,28}

Existe ainda a possibilidade de utilizar o NIPT como substituição apenas do rastreio bioquímico e não do RCPT completo. Sabe-se que, até ao momento, o NIPT não identifica muitas das alterações de gene único, não tem capacidade preditiva de complicações tardias da gravidez como pré-eclâmpsia ou parto pré-termo espontâneo, nem deteta defeitos do tubo neural. Por estes motivos, existe benefício em continuar a oferecer a todas as grávidas a quantificação de alfa-fetoproteína e a avaliação ecográfica.^{10,20,33} Adicionando-se a estes o NIPT, conseguir-se-ia aumentar a taxa de deteção de aneuploidias face ao método atual, diminuindo em simultâneo os falsos positivos, obtendo-se assim o mesmo benefício da redução de testes invasivos.^{11,46}

Existem já vários estudos publicados que mostram reduções significativas no número de testes invasivos efetuados após a introdução do NIPT como método de rastreio.^{11,47-50} Estes resultados promissores mostram que o número de testes pré-natais invasivos para confirmação de aneuploidias poderá diminuir com segurança no futuro através do aumento da disponibilidade e oferta do NIPT, conduzindo a uma redução das complicações e perdas fetais associadas a estas técnicas.^{11,16}

Apesar da ampla oferta mundial de NIPT, este encontra-se contemplado nas normas e programas nacionais de apenas alguns países. Na Europa, a Bélgica e os Países Baixos aconselham o NIPT como rastreio de primeira linha, enquanto os restantes incluem este rastreio em segunda linha, diferindo nas indicações e critérios adotados, bem como na estratégia de financiamento. Relativamente às aneuploidias rastreadas, a Bélgica, Países Baixos e a Itália contemplam o uso de NIPT para rastreio do genoma completo. Por sua vez, a Islândia, Dinamarca e Lituânia testam para T21, T18, T13, aneuploidias dos cromossomas sexuais e algumas microdeleções. A Suécia, Roménia e Eslovénia rastreiam as principais trissomias juntamente com as aneuploidias dos cromossomas sexuais. Já a Noruega, Finlândia, Inglaterra, País de Gales, Escócia, Alemanha e Polónia testam apenas para T21, T18 e T13. A França usa o NIPT para rastreio apenas de T21.^{51,52}

Em Portugal, o NIPT não está ainda incluído de forma sistemática e normalizada nos testes de rastreio pré-natal pela Direção-Geral da Saúde no SNS, embora esteja disponível no mercado. Por este motivo, perante um RCPT de risco aumentado e à luz do conhecimento atual e do estado da arte, se for proposto o NIPT os custos associados são suportados pelos progenitores. A escolha passa por isso entre um teste invasivo participado para confirmação diagnóstica, ou um NIPT com menores riscos, mas que acarreta custos que podem não ser acessíveis a todas as grávidas.

No Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB), o NIPT é proposto desde 2016 numa estratégia sequencial como opção perante fatores de risco aumentado de aneuploidia fetal, com a condicionante dos custos envolvidos. Desde então, as grávidas são informadas da possibilidade de realizar NIPT, com conhecimento dos respetivos riscos e benefícios comparativamente aos testes invasivos oferecidos pelo SNS.

Para avaliar os resultados obtidos com o uso do NIPT na população obstétrica do CHUCB, este estudo analisa todos os casos de grávidas que realizaram o NIPT nesta instituição até março 2022, no seguimento da vigilância da sua gestação. Pretende-se verificar, através da comparação dos resultados com o cariótipo fetal ou fenótipo do recém-nascido quando o cariótipo não foi estudado, se o NIPT poderia substituir com segurança o RCPT atualmente utilizado. Paralelamente será averiguado o impacto que a sua adoção poderia ter no número de procedimentos diagnósticos invasivos realizados nesta amostra.

Problema colocado: Poderia o NIPT substituir o RCPT sem comprometer o diagnóstico de cromossomopatias e, conseqüentemente, diminuir o número de testes invasivos necessários?

Hipótese 1 em estudo: O NIPT pode ser utilizado como método de rastreio pré-natal de primeira linha, substituindo com segurança o RCPT atualmente utilizado, diminuindo conseqüentemente o número de testes invasivos necessários.

Hipótese 2 em estudo: O NIPT pode ser utilizado como teste de rastreio pré-natal de segunda linha, em consequência de um RCPT de risco intermédio ou elevado, diminuindo o número de testes invasivos necessários.

1.2 Objetivos do estudo

Considerou-se, para analisar esta questão, explorar os seguintes objetivos gerais nesta investigação:

- Averiguar se o NIPT poderá ser utilizado como teste de primeira linha em substituição ao RCPT atual.
- Determinar o impacto que a implementação do NIPT poderia ter no número de amniocenteses realizadas.

Para concretizar estes objetivos, estipularam-se os seguintes objetivos específicos:

- Comparar os resultados do RCPT com os resultados do NIPT.
- Correlacionar os resultados do NIPT com os resultados do cariótipo, ou fenótipo à nascença quando não foi estudado o cariótipo.
- Correlacionar os resultados do RCPT com os resultados do cariótipo, ou fenótipo à nascença quando não foi estudado o cariótipo.
- Determinar a percentagem de resultados falsos positivos e falsos negativos do NIPT.
- Verificar se existe associação entre os resultados discordantes do NIPT com características maternas.
- Verificar se existe associação entre os resultados discordantes do NIPT com características da gestação.
- Determinar a taxa de IMG realizadas após diagnóstico de patologia genética fetal.
- Avaliar a taxa e a gravidade de efeitos adversos de amniocenteses realizadas no CHUCB.

2. Métodos

2.1 Tipo de Estudo

O presente estudo é classificado como observacional transversal retrospectivo, tendo por base a recolha e análise de dados de processos clínicos.

2.2 População em Estudo

Nesta investigação foram incluídas todas as grávidas acompanhadas no serviço de obstetrícia do CHUCB que realizaram NIPT entre fevereiro de 2016 e março de 2022. Neste período foram realizados 226 NIPT no CHUCB.

Considerou-se como critério de inclusão: grávidas seguidas em consultas de Obstetrícia no CHUCB que realizaram teste NIPT.

Considerou-se para critérios de exclusão: grávidas cuja gravidez não foi acompanhada no CHUCB; grávidas que não consentiram realizar NIPT; grávidas a quem foi prescrito NIPT, mas que não realizaram o teste; resultados de NIPT realizados antes das 10SG ou com FF<4%; grávidas sem registo das informações necessárias para este estudo no processo clínico eletrónico (ausência de resultado do NIPT, ou concomitantemente do cariótipo e fenótipo à nascença).

Para a obtenção da amostra foi solicitado ao Gabinete de Estudos, Planeamento e Informação para a Gestão do CHUCB a listagem de grávidas que realizaram NIPT neste período, dando origem a uma população inicial de 226 gestantes à qual foram posteriormente aplicados os critérios de exclusão supracitados.

Desta forma, contabilizam-se um total de 29 gestações excluídas e 197 gestações válidas incluídas no presente estudo (figura 1).

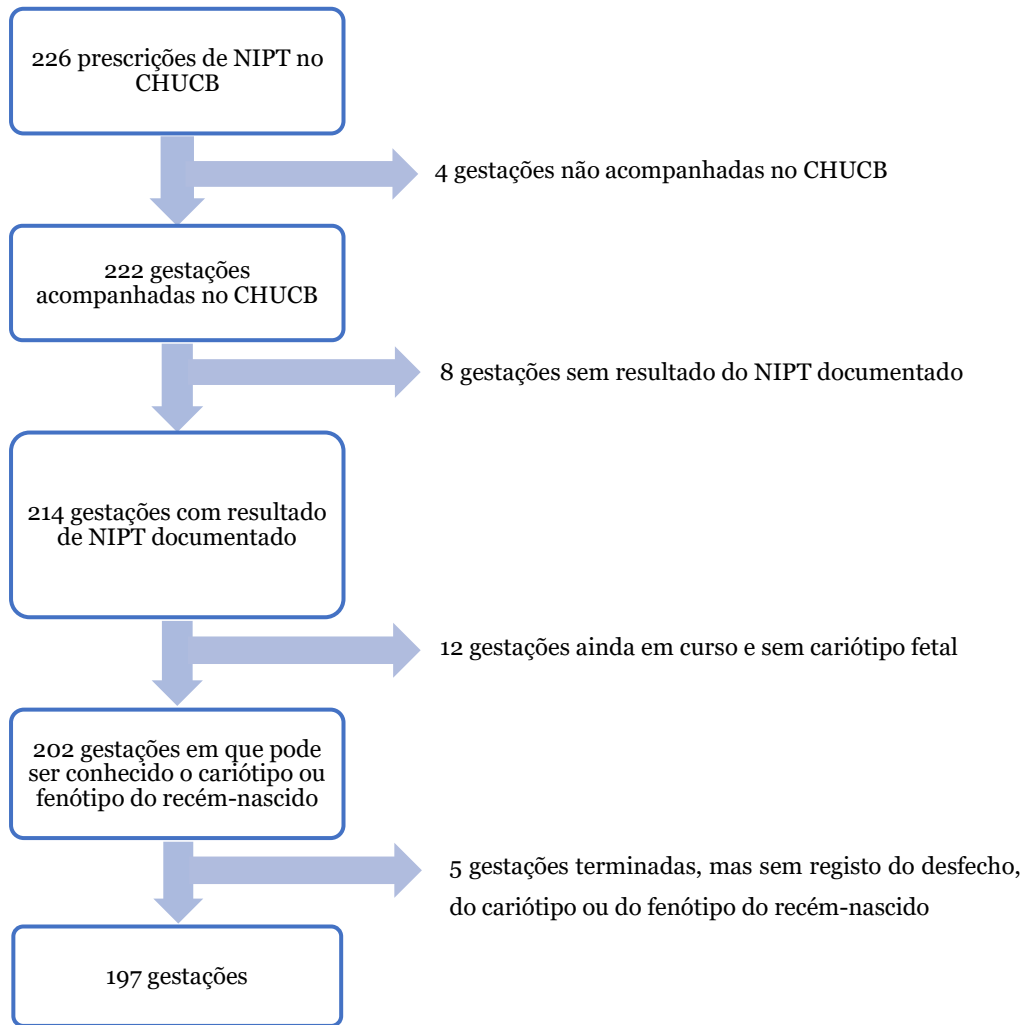


Figura 1: Fluxograma de seleção da amostra

2.3 Recolha de Dados

Para a realização deste estudo, foi obtido parecer favorável e a autorização do Presidente do Conselho de Administração, da Diretora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, da Comissão de Ética e do Serviço de Investigação, Epidemiologia e Saúde Pública (Gabinete de Investigação e Inovação) do CHUCB.

Os dados foram obtidos utilizando o programa informático *SCLínico Hospitalar*[®] para consulta dos processos clínicos das grávidas, e posteriormente foram codificados e anonimizados de forma irreversível numa base de dados em documento *Microsoft Excel 365*[®]. Após este processo, procedeu-se à análise dos mesmos, garantindo assim a confidencialidade e a proteção de dados.

2.4 Descrição das Variáveis

2.4.1 Variável Dependente

Presença de aneuploidia fetal detetada através de cariótipo fetal ou do fenótipo à nascença.

2.4.2 Variáveis Independentes

Tendo em conta os dados utilizados, podemos agrupá-los em cinco grupos: caracterização sociodemográfica, antecedentes obstétricos, antecedentes pessoais e familiares, parâmetros gestacionais e dados relativos ao recém-nascido.

Foram analisadas as seguintes variáveis para cada parâmetro:

- Caracterização sociodemográfica: Idade materna.
- Antecedentes obstétricos: Utilização de técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) para a gravidez atual.
- Antecedentes pessoais e familiares: IMC no início da gestação, história pessoal e familiar de patologias genéticas ou malformações congénitas, história pessoal de patologias autoimunes, terapêutica com heparina quando foi obtida a amostra para o NIPT, hábitos tabágicos da grávida.
- Parâmetros gestacionais: Idade gestacional no momento do NIPT e do teste diagnóstico invasivo, quando aplicável; gravidez única ou múltipla; corionicidade; resultado do RCPT e do estudo ecográfico do primeiro trimestre; tecnologia de NIPT utilizada; resultado do NIPT e FF; tipo de teste invasivo realizado, quando aplicável; resultado do teste invasivo; eventos adversos resultantes do teste pré-natal invasivo; desfecho da gravidez (interrupção médica da gravidez, aborto espontâneo, morte intrauterina, parto pré-termo, parto de termo).
- Dados do feto/ recém-nascido: presença de malformações ou dismorfismos detetáveis por fenótipo à nascença; cariótipo, quando estudado; estudo citogenético do produto de IMG, quando aplicável.

2.5 Protocolo do estudo

Este estudo centra-se no rastreio de aneuploidias fetais do primeiro trimestre.

As grávidas que realizaram o acompanhamento da sua gravidez no CHUCB realizaram o RCPT como parte do rastreio implementado pelo Programa Nacional para a Vigilância da Gravidez de Baixo Risco, sendo este o rastreio padrão atualmente em vigor. Simultaneamente, as gestantes incluídas nesta amostra optaram por realizar também o NIPT.

De acordo com o *American Congress of Obstetricians and Gynecologists*, as seguintes características maternas foram consideradas como indicadores de risco aumentado para aneuploidia fetal: idade materna igual ou superior a 35 anos no momento do parto, aneuploidia ou malformação congénita em gravidez anterior, antecedentes pessoais e familiares de aneuploidias, RCPT de risco intermédio e elevado, e a existência de anomalias identificadas na ecografia do 1º trimestre.⁵³

Os resultados quer do rastreio padrão, quer do NIPT foram comunicados e explicados às grávidas, que decidiram realizar ou não um teste invasivo posteriormente a terem conhecimento destes dados. A recusa de teste invasivo está documentada nos processos clínicos.

Considerou-se, para efeitos deste estudo, os seguintes limites na estratificação de risco obtida pelo RCPT: >1:150 risco elevado, 1:150-1:1000 risco intermédio, <1:1000 baixo risco. Estes limites foram adotados tendo por base os valores que demonstraram ser mais eficazes para a implementação do NIPT no Reino Unido.⁵⁴ Os resultados do NIPT foram categorizados em: alta probabilidade ou baixa probabilidade para a aneuploidia em questão.

Nos resultados discordantes (falsos positivos e falsos negativos) e indeterminados do NIPT foi avaliada a presença de fatores que potencialmente afetam a FF, nomeadamente: patologia autoimune materna, gravidez conseguida com recurso a técnicas de PMA, terapêutica com heparina, tabagismo, idade materna, excesso de peso materno, gravidez múltipla, e o diagnóstico de trissomia fetal.

A determinação de anomalia cromossómica fetal foi feita utilizando como *gold-standard* o resultado do estudo do cariótipo, sempre que este foi realizado. Na ausência de cariótipo, recorreu-se ao exame físico do recém-nascido com avaliação da presença de características fenotípicas, sem as quais o recém-nascido foi considerado euploide. Nas gestações que terminaram em IMG, foi obtido o resultado do estudo citogenético para confirmação.

Para determinação das gestações com indicação para realizar teste diagnóstico invasivo foram utilizadas as diretrizes da *International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* (ISUOG).¹²

Os dados de gestações ainda em curso durante a presente investigação foram incluídos apenas nos casos em que foi realizado diagnóstico pré-natal fetal com cariótipo.

As gestações bicoriônicas e gestações que por iniciarem o seguimento tardiamente não realizaram RCPT, foram consideradas apenas para avaliação da performance do NIPT.

2.6 Análise Estatística

O tratamento dos dados e análise estatística foi realizada com recurso aos softwares *Microsoft Excel 365*[®] e *IBM SPSS 27.0*[®] (*IBM Corporation, Statistical Package for Social Sciences*), avaliando-se ao nível de significância de 5%.

Foi realizada análise descritiva, utilizando frequências e percentagens para descrever variáveis qualitativas, e médias, mediana e desvio padrão no caso de variáveis quantitativas. Para analisar a associação entre duas variáveis qualitativas foi utilizado o teste de qui-quadrado. No entanto, quando a percentagem de células com contagem esperada inferior a 5 foi superior a 20%, apresenta-se o resultado do teste de Fisher.

Foi utilizado o teste de McNemar para analisar diferenças entre duas variáveis qualitativas dicotômicas, referentes aos mesmos sujeitos.

Para analisar a capacidade discriminativa de cada teste em estudo foi utilizada a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A área por baixo da curva ROC (AUC) pode variar entre 0.5 a 1, sendo que 0.5 significa que o método não tem qualquer capacidade discriminativa, entre 0.7 e 0.8 considera-se uma capacidade discriminativa aceitável e um valor superior a 0.9 significa que tem uma excelente capacidade discriminativa.⁵⁵

2.7 Considerações Éticas

Para a realização desta investigação, foi obtida autorização do Conselho de Administração do CHUCB, do Responsável de Acesso à Informação e Encarregado de Proteção de Dados, da Diretora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, e da Comissão de Ética do CHUCB, tendo recebido parecer favorável e consequentemente sido aprovada (em anexo).

O sigilo e confidencialidade dos dados foram garantidos durante todo o projeto. A base de dados, incluindo todos os dados recolhidos para o âmbito do presente estudo, foram destruídos após a sua conclusão.

3. Resultados

3.1 Caracterização sociodemográfica da amostra

No total, 197 gestações integram a presente amostra. As medidas descritivas relativas à caracterização da amostra são apresentadas na tabela 1.

A idade materna variou entre o mínimo de 26 anos e o máximo de 48 anos, sendo a média de idades 37 anos, com um desvio-padrão (DP) de 2.88. 181 gestantes (91.9%) apresentavam idade igual ou superior a 35 anos, enquanto 16 gestantes (8.1%) tinham idade inferior a 35 anos.

Relativamente a antecedentes maternos de risco, além da idade, verificou-se que apenas 5 gestantes (2.5%) apresentavam doença autoimune. Quanto a hábitos tabágicos, 170 gestantes (86.3%) eram não fumadoras, 12 (6.1%) eram ex-fumadoras, tendo cessado os hábitos tabágicos antes da gravidez, e 15 (7.6%) eram fumadoras durante a gestação.

No que concerne ao peso materno, este variou entre o mínimo de 43Kg e o máximo de 158Kg, sendo o peso médio de 64.72Kg (DP= 14.26). Estes dados corresponderam a um IMC materno mínimo de 16.8Kg/m² e máximo de 55.3Kg/m², com um IMC médio das gestantes de 24.55Kg/m². Como tal, verificou-se que 119 gestantes (60.4%) apresentavam IMC < 25Kg/m², enquanto 78 (39.6%) apresentavam IMC ≥ 25Kg/m².

Das 197 gestações que integram a amostra, 188 (95.43%) eram gravidezes de alto risco, enquanto 9 (4.57%) eram gestações de baixo risco. Verificou-se ainda que 166 gestações (84.3%) foram espontâneas, enquanto 31 gestações (15.7%) foram obtidas com recurso a técnicas de PMA. 188 gestações são de feto único (95.43%), 7 são gemelares bicoriónicas (3.55%) e 2 gemelares monocoriónicas (1.02%).

Quanto à prevalência de aneuploidias, 193 fetos são euploides, e aos restantes 4 foi diagnosticada uma aneuploidia: 2 casos de T21, 1 caso de Síndrome de Klinefelter e 1 caso de triploidia 69,XXX.

Tabela 1: Caracterização sociodemográfica e das gestações da amostra

	Variáveis	n	%
Idade materna	<35 anos	16	8.1
	≥35 anos	181	91.9
Doença autoimune	Sim	5	2.5
	Não	192	97.5
Hábitos tabágicos	Não Fumadoras	170	86.3
	Ex-fumadoras	12	6.1
	Fumadoras	15	7.6
IMC	< 25Kg/m ²	119	60.4
	≥ 25Kg/m ²	78	39.6
Gravidez única/múltipla	Única	188	95.43
	Gemelar monocoriônica	2	1.02
	Gemelar bicoriônica	7	3.55
Grau de risco da gravidez	Alto risco	188	95.43
	Baixo risco	9	4.57
Método de concepção	PMA	31	15.7
	Espontânea	166	84.3

3.2 Testes NIPT utilizados

Verificou-se que os testes NIPT utilizados no CHUCB eram majoritariamente da marca Harmony, tendo sido utilizados 120 testes desta marca (61%), seguida da marca Trust, a segunda mais utilizada, com 62 testes realizados (31.4%) e, ainda, 15 testes da marca Prenatest (7.6%) (tabela 2).

A tecnologia NIPT utilizada na maioria dos testes foi t-MPS, no caso de 120 gestantes (61%). Nas restantes 77 gestantes (39%) foi utilizada a tecnologia WGS.

Tabela 2: Caracterização dos testes NIPT utilizados

Marca	Teste NIPT	Parâmetros avaliados				n	%
		T13, T18, T21	Aneuploidias Cromossomas sexuais	Microdeleções	23 pares cromossomas		
Trust (WGS)	Just	X				2	1.0
	Trust	X	X			4	2.0
	Trust Plus	X	X	X		3	1.5
	Trust Premium	X	X	X	X	53	26.9
Harmony (t-MPS)	Harmony	X				93	47.2
	Harmony X	X	Monossomia X			8	4.1
	Harmony Y	X				9	4.6
	Harmony XY	X	X			10	5.1
Prenatest (WGS)	OP1	T21				11	5.6
	OP2	X		22q11.2		3	1.5
	OP3	X	X	X		1	0.5
Total						197	100%

3.3 Resultados discordantes e indeterminados do NIPT

Relativamente aos resultados dos NIPT, verificou-se que, entre os 197 resultados, 191 indicaram baixa probabilidade e 6 indicaram elevada probabilidade de aneuploidia.

Nos 6 resultados de NIPT de elevada probabilidade para aneuploidia, apenas 3 casos tiveram patologia genética diagnosticada: dois casos de T21 e um Síndrome de Klinefelter. Este achado indica a existência de 3 falsos positivos nos NIPT realizados.

Existiu ainda uma gestação que obteve o resultado de baixa probabilidade de aneuploidia no NIPT e o feto tinha patologia genética (falso negativo). Salienta-se, no entanto, que este resultado não é um verdadeiro falso negativo deste teste, dado que a patologia diagnosticada foi triploidia 69,XXX, que não é detetável por NIPT. Tal sucede visto que o NIPT identifica a proporção de ADN fetal e, como todos os cromossomas em fetos triploides são trissómicos, a sua proporção é idêntica à de fetos euploides, não sendo por isso detetável através deste método.

Verificaram-se também 4 NIPT com resultados indeterminados, sendo que estes tinham RCPT de baixo risco, e os fetos eram euploides.

3.3.1. Associação com características maternas e da gestação

De seguida, foi analisada a possível associação entre as características maternas e da gestação e os resultados do NIPT realizados na amostra, classificados em verdadeiros positivos, verdadeiros negativos e falsos positivos (tabela 3). Não se verificaram, no entanto, associações estatisticamente significativas entre os resultados do NIPT e as características maternas e da gestação analisadas ($p > 0.05$).

Em relação à idade materna, observa-se que em todos os grupos a mediana (Mdn) foi superior a 35 anos, sendo ligeiramente superior nos casos que revelaram ser verdadeiros positivos de aneuploidias fetais (Mdn= 37 anos). No que concerne ao IMC, o único grupo em que a mediana se encontra num intervalo correspondente a excesso de peso foi nos falsos positivos (Mdn= 27.80Kg/m²). Observa-se que a maioria das mães são não fumadoras (verdadeiros negativos, 86.8%; verdadeiros positivos, 66.7%; falsos positivos, 66.7%) e que todos os casos em que as mães eram fumadoras (7.9%) foram verdadeiros negativos. Verifica-se que das gestantes com patologia autoimune, 2.1% (n= 4) apresentaram um resultado verdadeiro negativo, sendo que não existe nenhum caso no grupo de verdadeiros positivos e apenas um (33.3%) nos falsos positivos. Relativamente à terapêutica com heparina, 6.8% das mães (n= 13) no grupo de verdadeiros negativos estavam sob esta terapêutica, não havendo nenhum caso no grupo de verdadeiros positivos e apenas um (33.3%) no grupo de falsos positivos.

No que se refere a características da gravidez, a maioria dos casos são de gravidez única nos grupos de verdadeiros negativos e verdadeiros positivos (95.8% e 66.7%, respetivamente), não existindo casos de gravidezes gemelares nos falsos positivos. Apenas 15.3% (n= 29) dos casos no grupo de verdadeiros positivos e 33.3% (n= 1) no grupo de verdadeiros positivos são de gravidez por PMA, verificando-se que os 3 falsos positivos foram gestações espontâneas.

Tabela 3: Associação entre resultados obtidos por NIPT e características maternas e da gestação

	Verdadeiros negativos (n= 190)	Verdadeiros positivos (n= 3)	Falsos positivos (n= 3)	p
Características maternas				
Idade (Mdn, AIQ)	36.00 (4.00)	37.00 (---)	36.00 (---)	0.569
IMC (Mdn, AIQ)	23.80 (5.60)	20.20 (---)	27.80 (---)	0.470
Tabagismo (n, %)				0.116
Não	165 (86.8)	2 (66.7)	2 (66.7)	
Ex-fumadora	10 (5.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	
Fumadora	15 (7.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Doença autoimune (n, %)	4 (2.1)	0 (0.0)	1 (33.3)	0.145
Terapêutica heparina (n, %)	13 (6.8)	0 (0.0)	1 (33.3)	0.363
Características da gravidez				
Gravidez única (n, %)	182 (95.8)	2 (66.7)	3 (100.0)	0.249
Gravidez por PMA (n, %)	29 (15.3)	1 (33.3)	0 (0.0)	0.636

Nota: AIQ = Amplitude interquartílica; (---) AIQ não passível de ser calculado, dada a reduzida dimensão da amostra.

Quanto aos resultados indeterminados (tabela 4), verifica-se que todos eram gestações únicas e que corresponderam a gravidezes de termo. A idade materna superior a 35 anos verificou-se em todos os NIPT indeterminados e 3 dos 4 casos foram gestações obtidas com recurso a técnicas de PMA.

Tabela 4: Descrição dos resultados indeterminados obtidos por NIPT

NIPT	RCPT	Cariótipo/ Fenótipo	Desfecho da gravidez	Características maternas e/ou da gestação verificadas
Sem resultado	Baixo risco	Euploide	Gravidez de termo	Gestante >35 anos
Sem resultado	Baixo risco	Euploide	Gravidez de termo	Gestante >35 anos, gravidez pós-PMA, IMC>25
Sem resultado	Baixo risco	Euploide	Gravidez de termo	Gestante >35 anos, gravidez pós-PMA, terapêutica com heparina
Sem resultado	Baixo risco	Euploide	Gravidez de termo	Gestante >35 anos, gravidez pós-PMA, terapêutica com heparina

3.4 Comparação entre os métodos de rastreio

Neste ponto pretende-se comparar, através dos testes estatísticos de qui-quadrado e de McNemar, os resultados obtidos entre os métodos atuais de rastreio e os resultados obtidos por testes diagnósticos, nomeadamente: entre os resultados do RCPT e o cariótipo/fenótipo à nascença, entre os resultados do NIPT e o cariótipo/fenótipo à nascença e, por último, comparar a performance do NIPT com a do RCPT.

3.4.1. Comparação dos resultados do RCPT com o cariótipo/ fenótipo à nascença

A figura 2 representa as 185 gestações em que foi realizado RCPT, das quais 3 fetos tinham aneuploidia e 182 eram euploides.

Para simplificação da análise, será considerado que 143 gestantes obtiveram resultado negativo no RCPT (correspondente a baixo risco), enquanto 42 gestantes obtiveram resultado positivo (risco intermédio ou risco elevado).

Para analisar a associação entre os resultados do RCPT e o cariótipo/ fenótipo à nascença foi utilizado o teste de Fisher, que revelou não existir uma associação estatisticamente significativa entre os resultados do RCPT e o cariótipo/fenótipo à nascença (Teste de Fisher, $p= 0.130$). No entanto, embora não seja significativo, observa-se que em 66.7% dos casos em que foi diagnosticada patologia genética fetal ($n= 2$), o resultado do RCPT foi de risco intermédio ou elevado.

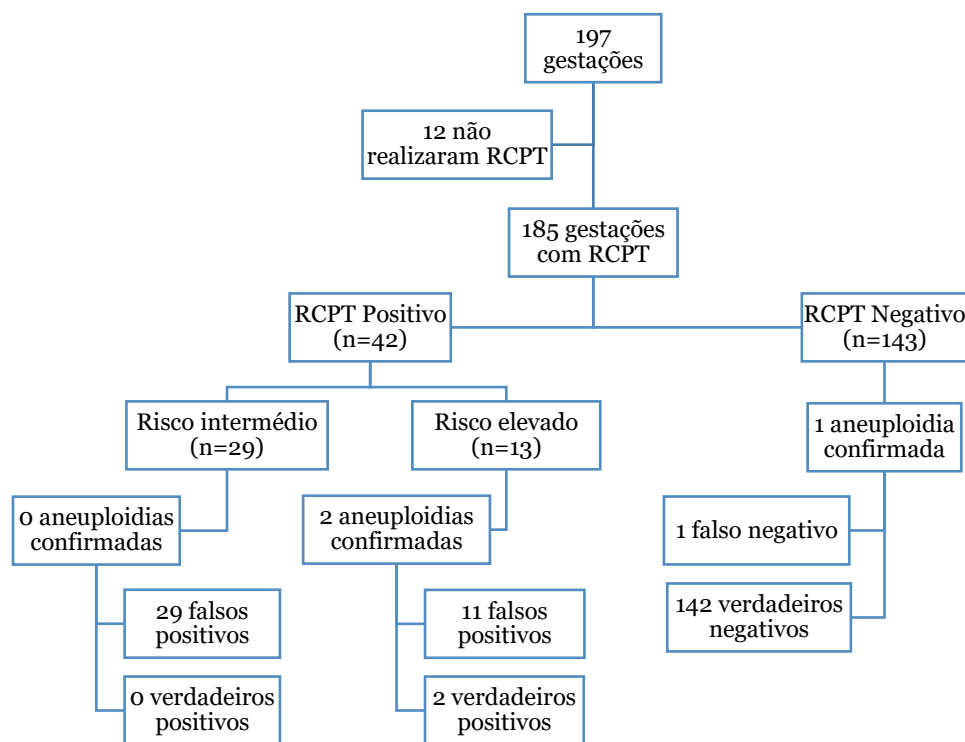


Figura 2: Resultados obtidos pelo RCPT

A tabela 5 apresenta os dados relativos ao desempenho do RCPT na deteção de aneuploidias. No caso das 42 gestantes em que o resultado do RCPT foi considerado positivo, 2 fetos apresentavam anomalias cromossómicas (verdadeiros positivos) e 40 eram euploides (falsos positivos). Assim, o valor preditivo positivo foi de 4.76% e a taxa de falsos positivos 21.62%.

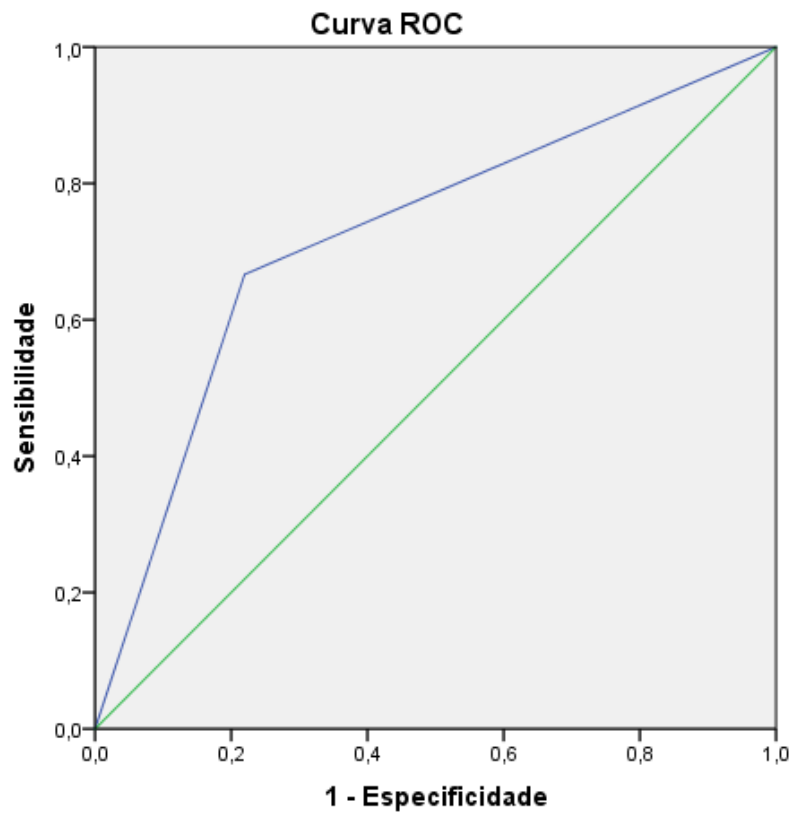
Nas gestações que obtiveram resultado negativo (n=143 gestantes), foram observados 142 fetos euploides e 1 com anomalia cromossómica. Deste modo, o valor preditivo negativo foi de 99.30%.

Dos 3 casos de aneuploidias, o RCPT apresentou resultado positivo em 2 deles. Assim, a sensibilidade do teste foi 66.67% para o total de patologias cromossómicas fetais detetadas e a especificidade do teste foi 78.02%.

A AUC para o RCPT, representada na figura 3, foi de 0.72 (p= 0.185; CI 95% 0.41, 1.00), indicando uma capacidade discriminativa aceitável.

Tabela 5: Desempenho do RCPT na deteção de aneuploidias

Variável	Alterações cromossómicas (95% CI)
Sensibilidade	66.67% (9.43-99.16)
Especificidade	78.02% (71.30-83.81)
Valor preditivo positivo	4.76% (2.10-10.43)
Valor preditivo negativo	99.30% (96.62-99.86)
Falsos Positivos	n=40 / 21.62%
Falsos Negativos	n=1 / 0.54%
Verdadeiros Positivos	n=2 / 1.08%
Verdadeiros Negativos	n=142 / 76.76%
Exatidão do teste	77.84% (71.16-83.60)



Os segmentos diagonais são produzidos por empates.

Figura 3: Curva ROC para RCPT na deteção de aneuploidias

3.4.2. Comparação dos resultados do NIPT com o cariótipo/ fenótipo à nascença

Para analisar a associação entre os resultados do NIPT e o cariótipo/ fenótipo à nascença foi utilizado o teste de Fisher, que apontou a existência de uma associação estatisticamente significativa entre os resultados do NIPT e o cariótipo/fenótipo à nascença (Teste de Fisher, $p < 0.001$).

Entre as 197 gestações em que foi realizado NIPT, em 193 o feto era euploide e 4 tinham aneuploidia. A figura 4 apresenta os resultados obtidos pelo NIPT.

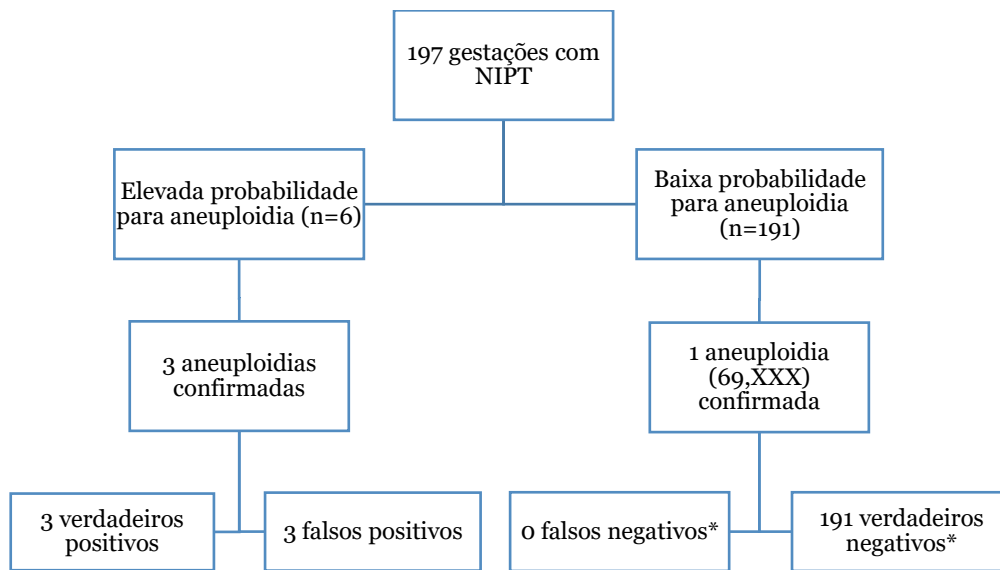


Figura 4: Resultados obtidos pelo NIPT

*Considerando que a triploidia 69,XXX não é detetável no NIPT efetuado.

Considerando-se que 3 casos euploides apresentaram elevada probabilidade de aneuploidia no NIPT, obteve-se uma taxa de falsos positivos de 1.52% e uma especificidade de 98.45% (tabela 6).

Observa-se que dos casos com patologia genética fetal diagnosticada, 75% (n= 3) tinham elevada probabilidade de aneuploidia segundo o NIPT. Assim poder-se-ia considerar uma sensibilidade do teste de 75% para o total de anomalias cromossômicas. No entanto, a alteração de cariótipo que não foi identificada pelo NIPT (69,XXX) não é detetável nos NIPT utilizados, pelo que se poderá considerar uma sensibilidade de 100% para as anomalias testadas.

Nas gestações em que o resultado do NIPT foi considerado de elevada probabilidade (n=6), 3 fetos apresentaram anomalias cromossômicas (dois casos de T21 e um de 47,XXY) e 3 apresentaram cariótipo normal. Assim, o valor preditivo positivo do teste foi de 50%. Já

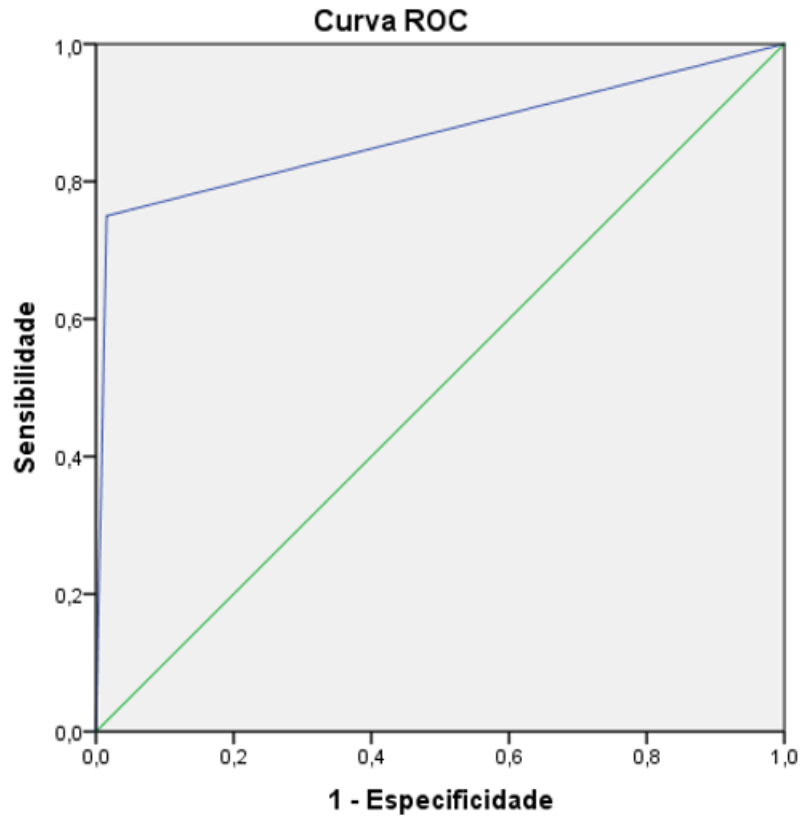
quando o resultado foi considerado baixa probabilidade (n=191) foram observados 190 fetos euploides e 1 com anomalia cromossômica (69,XXX), mas sendo esta não detetável pelo NIPT utilizado, para efeitos estatísticos não será considerada para a performance do teste. Deste modo, o valor preditivo negativo do teste foi de 100%.

A AUC para o NIPT, representada na figura 5, foi de 0.87 (p= 0.012; CI 95% 0.61, 1.00), indicando uma boa capacidade discriminativa.

Tabela 6: Desempenho do NIPT na detecção de aneuploidias

Variável	Alterações cromossômicas (95% CI)
Sensibilidade	100% (29.24-100)*
Especificidade	98.45% (95.55-99.68)
Valor preditivo positivo	50% (24.55-75.45)
Valor preditivo negativo	100%*
Falsos Positivos	n=3 (1.52%)
Falsos Negativos	n=0 (0%)*
Verdadeiros Positivos	n=3 (1.52%)
Verdadeiros Negativos	n=191 (96.95%)*
Exatidão do teste	98.48% (95.61-99.68)

*Considerando que a triploidia 69,XXX não é detetável no NIPT efetuado.



Os segmentos diagonais são produzidos por empates.

Figura 5: Curva ROC para NIPT na detecção de aneuploidias

3.4.3. Comparação do desempenho do NIPT e do RCPT

Para comparar os resultados do NIPT e do RCPT, utilizou-se o teste de McNemar, que apontou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos dois testes ($p < 0.001$). A tabela 7 apresenta a comparação do desempenho dos dois testes.

Verificou-se que 41 casos foram identificados pelo NIPT como apresentando baixa probabilidade de doença genética, mas tinham RCPT positivo (29 de risco intermédio e 12 de risco elevado), e 4 casos classificados pelo NIPT como tendo elevada probabilidade de aneuploidia foram considerados de baixo risco pelo RCPT.

Por outro lado, 139 resultados de baixo risco no RCPT, 29 de risco intermédio e 12 de risco elevado, obtiveram uma baixa probabilidade de aneuploidia no NIPT. 4 gestações de baixo risco e uma de risco elevado no RCPT, obtiveram um NIPT de elevada probabilidade de aneuploidia.

Tabela 7: Comparação do desempenho do RCPT com o NIPT na detecção de aneuploidias

Variável	Rastreio padrão: RCPT n=185	NIPT		
		Todas as gestações n=197	Com RCPT positivo n=42	Com RCPT negativo n=143
Verdadeiros Positivos – n (%)	n=2 (1.08%)	n=3 (1.52%)	n=1 (2.38%)	n=1 (0.70%)
Verdadeiros Negativos – n (%)	n=142 (76.76%)	n=191 (96.95%)*	n=41 (97.62%)*	n=139 (97.20%)
Falsos Positivos – n (%)	n=40 (21.62%)	n=3 (1.52%)	n=0 (0%)	n=3 (2.10%)
Falsos Negativos – n (%)	n=1 (0.54%)	n=0 (0%)*	n=0 (%)*	n=0 (0%)
Sensibilidade – % (95% CI)	66.67% (9.43-99.16)	100% (29.24-100)*	100% (2.5-100)*	100% (2.5-100)
Especificidade – % (95% CI)	78.02% (71.30-83.81)	98.45% (95.55-99.68)	100% (91.4-100)	97.89% (93.95-99.56)
Valor preditivo positivo – % (95% CI)	4.76% (2.10-10.43)	50% (24.55-75.45)	100%	25% (9.81-50.52)
Valor preditivo negativo – % (95% CI)	99.30% (96.62-99.86)	100%*	100%*	100%
Exatidão – % (95% CI)	77.84% (71.16-83.60)	98.48% (95.61-99.68)	100% (91.59-100)	97.90% (93.99-99.57)

*Considerando que a triploidia 69,XXX não é detetável no NIPT efetuado.

3.5 Impacto do uso de NIPT no número de procedimentos invasivos

3.5.1. Gestações da amostra com critério para amniocentese

Das 32 gestantes da amostra que preenchiam critérios para serem submetidas a amniocentese ¹² (figura 6), apenas 8 realizaram o teste invasivo.

Destas 32, uma tinha RCPT de risco elevado e o NIPT revelou elevada probabilidade de aneuploidia, confirmando a necessidade de realizar um teste diagnóstico invasivo, que veio demonstrar ser um caso de T21.

Por sua vez, 7 grávidas optaram por prosseguir com o teste invasivo embora tenham obtido um resultado de baixa probabilidade de aneuploidia no NIPT. Destas 7, 6 tinham RCPT positivo, incluindo o caso de triploidia 69,XXX, e 6 fetos eram euploides embora apenas 1 tivesse um RCPT negativo.

As restantes 24 gestantes com critério para amniocentese recusaram o teste invasivo após conhecimento do resultado do NIPT de baixa probabilidade para aneuploidia. Destas, não se confirmou aneuploidia em nenhum dos fetos e 7 tinham RCPT positivo, 16 negativo e 1 não realizou RCPT.

Assim, na presente amostra o NIPT evitou 24 das 32 amniocenteses que eram necessárias, não tendo existido falsos negativos. Verifica-se adicionalmente que outras 7 gestantes poderiam também ter optado pela não realização de amniocentese após um NIPT de baixa probabilidade para aneuploidia, embora neste caso tal levasse à falha de diagnóstico do caso de triploidia 69,XXX que não era detetável por NIPT. O único caso com critério para amniocentese em que o NIPT indicou uma probabilidade elevada de aneuploidia confirmou-se ser um caso de T21.

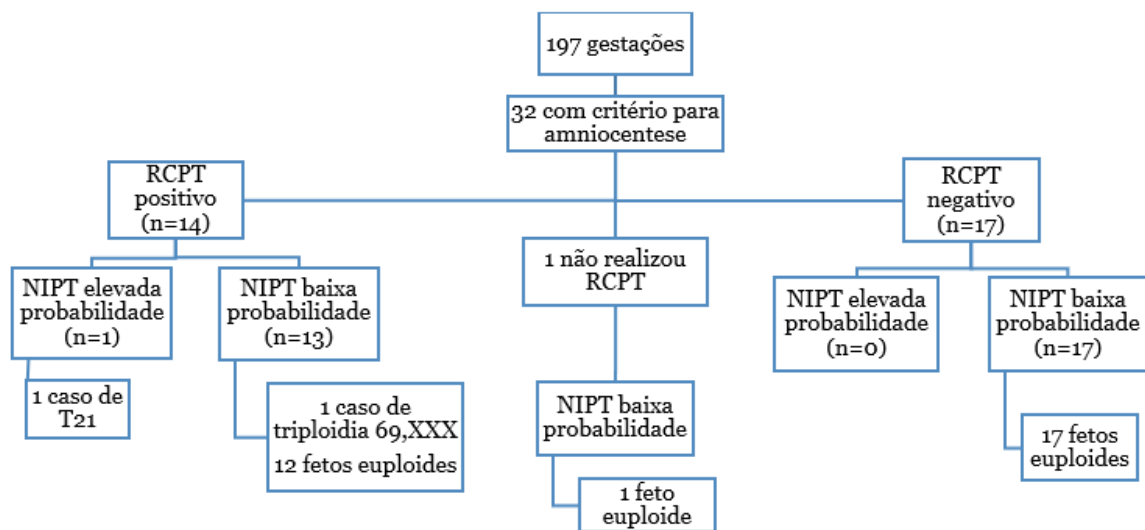


Figura 6: Gestações da amostra com critério para amniocentese

3.5.2. Amniocenteses realizadas na amostra

No total das 197 gestações que realizaram NIPT, 182 gestantes não realizaram amniocentese (92.4%), enquanto apenas 15 (7.6%) optaram pelo teste diagnóstico invasivo. Os resultados do cariótipo demonstraram 12 casos de euploidia, 1 caso de triploidia 69,XXX, e 2 casos de T21.

Dos 15 casos em que foi realizado cariótipo fetal, 6 tinham um RCPT negativo e corresponderam a fetos que demonstraram ser euploides. 8 dos casos em que se conhece o

cariótipo tinham um RCPT positivo, embora 6 sejam euploides e apenas 2 tenham aneuploidias diagnosticadas (um caso de T21 e um de triploidia 69,XXX). Por fim, houve um caso sem RCPT em que foi feita amniocentese, pelo que não é possível incluir na análise destes resultados.

Destes 15 kariótipos efetuados, 10 tinham baixa probabilidade para aneuploidia pelo NIPT, embora um seja um caso de triploidia 69,XXX, não detetável neste teste, e 9 corresponderam ao resultado obtido na amniocentese, verificando-se que poderia ter-se evitado a amniocentese nestes casos. Os restantes 5 dos 15 casos em que foi obtido o kariótipo tinham um NIPT de elevada probabilidade de aneuploidia, dos quais 3 eram euploides (falsos positivos do NIPT) e 2 foram casos de T21 (verdadeiros positivos do NIPT) (figura 7).

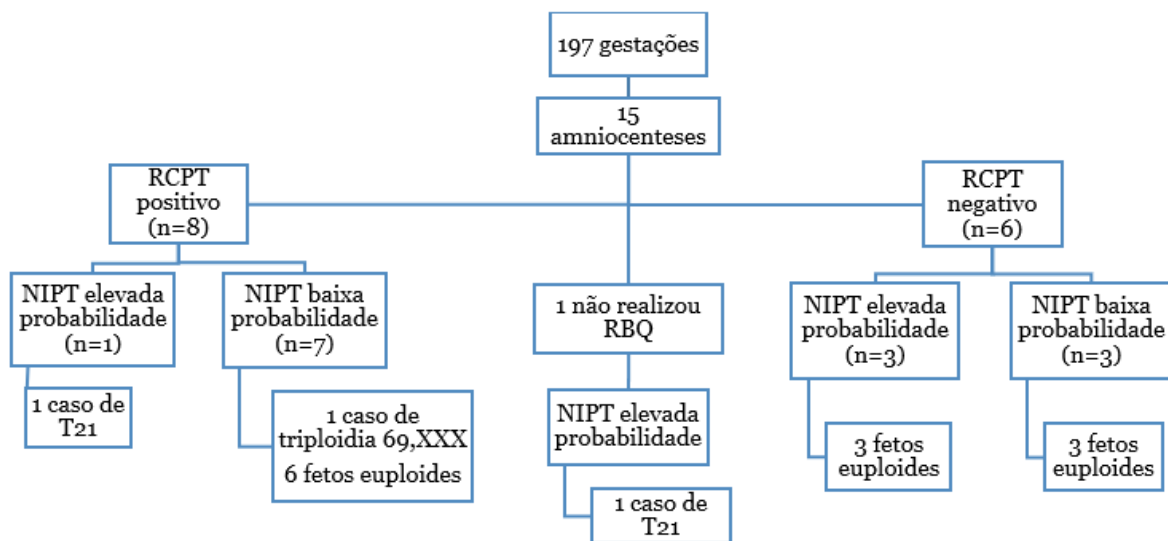


Figura 7: Amniocenteses realizadas na amostra

3.5.3. Impacto do NIPT no número de testes invasivos necessários

De acordo com as hipóteses em estudo, importa analisar quantos casos de testes invasivos estariam indicados se o NIPT tivesse sido utilizado em substituição do RCPT (figura 8), bem como a quantas gestantes poderia ser proposta a amniocentese se o NIPT fosse aplicado apenas às gestações com RCPT positivo (figura 9). Observa-se, assim, que a hipótese 2 permitiria uma redução mais acentuada das amniocenteses indicadas.

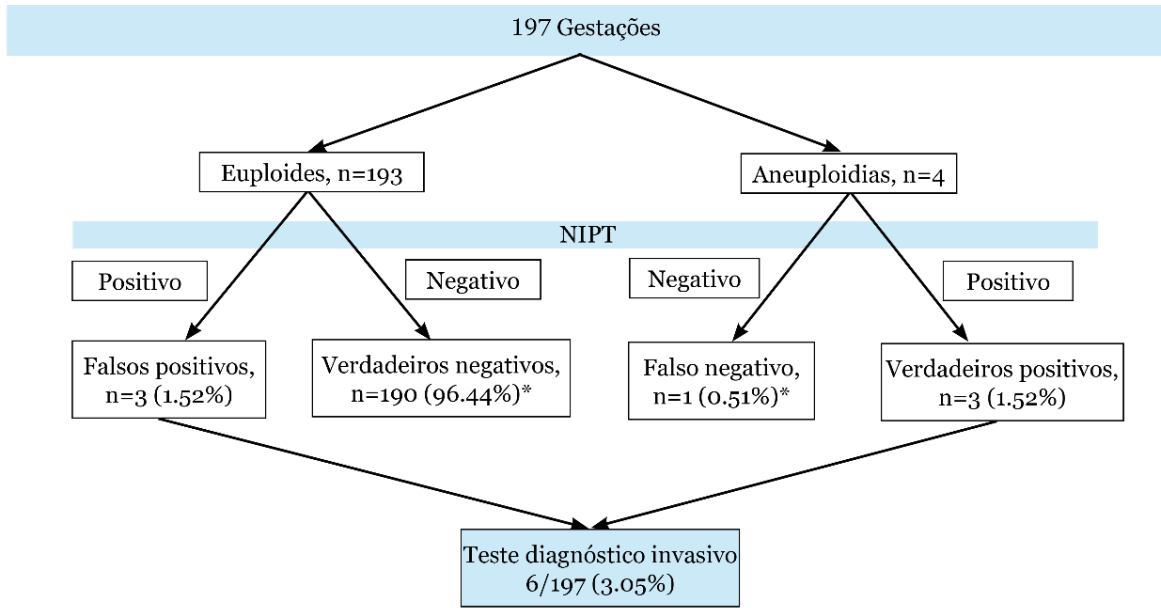


Figura 8: Testes diagnósticos invasivos necessários se o NIPT fosse o rastreio de primeira linha

*Falso negativo não considerado por a triploidia 69,XXX não ser detetável por NIPT.

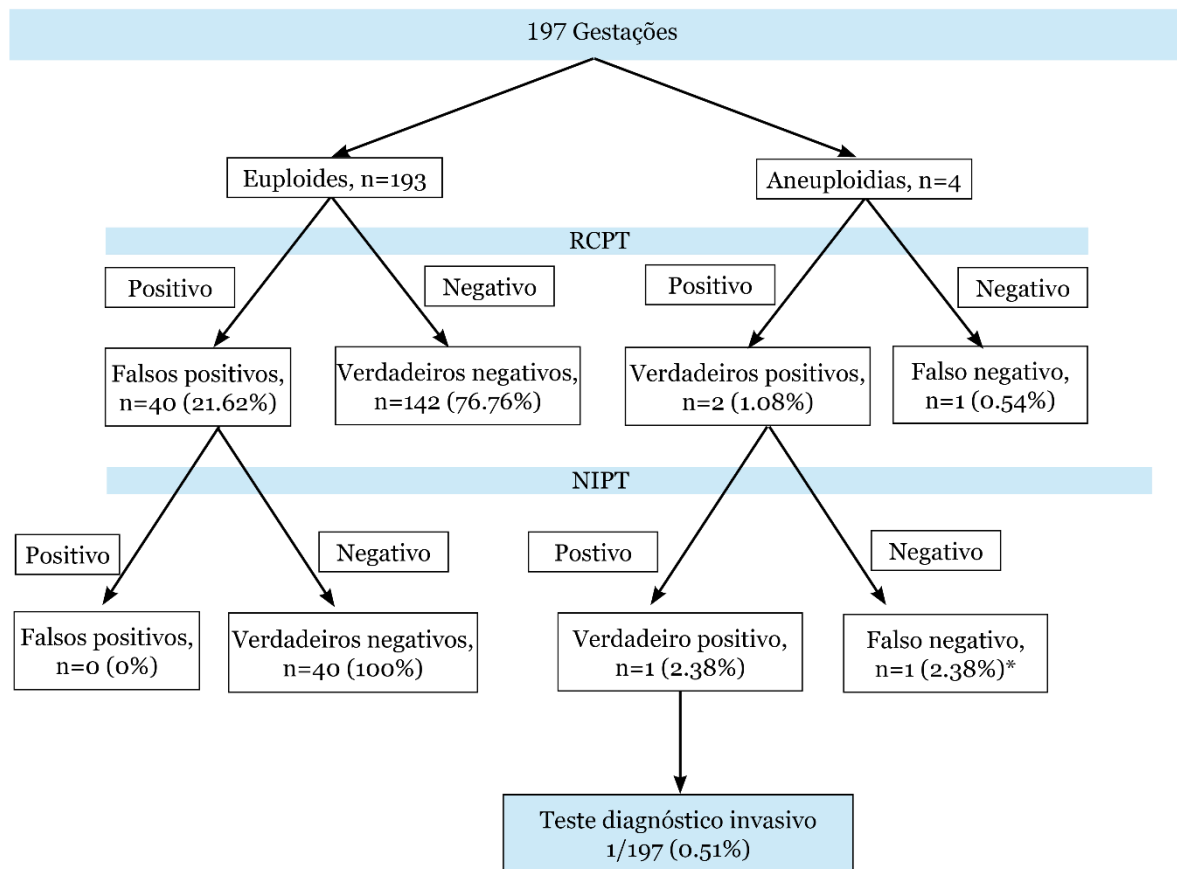


Figura 9: Testes diagnósticos invasivos necessários se o NIPT fosse rastreio de segunda linha, após RCPT positivo

*Falso negativo não considerado por a triploidia 69,XXX não ser detetável por NIPT.

3.6 Efeitos adversos de amniocenteses realizadas no CHUCB

Das 197 gestações, 15 realizaram amniocentese, correspondendo a 7.6% da amostra. Nestas, não se verificaram efeitos adversos em consequência da amniocentese.

3.7 IMG realizadas após diagnóstico de patologia genética fetal

Nas gestações que terminaram em IMG, o diagnóstico foi confirmado por estudo citogenético.

Dos 4 casos de aneuploidias diagnosticadas, em três o desfecho foi uma IMG, nomeadamente num dos casos de T21 às 18SG, no segundo caso de T21 às 22+2SG e na triploidia 69,XXX às 19SG.

Observa-se, por isso, que da população que obteve um NIPT que demonstrava uma elevada probabilidade de aneuploidia no CHUCB (n= 6), 3 tinham uma anomalia cromossômica (dois casos de T21 e um Síndrome de Klinefelter), que culminaram em IMG em 66.67% dos casos (os dois T21). Um caso de triploidia 69,XXX não detetável por NIPT teve o mesmo desfecho, demonstrando que os progenitores optaram por IMG em 75% dos casos totais de aneuploidia diagnosticada nesta amostra.

Assim, apenas o caso do Síndrome de Klinefelter teve desfecho num nado-vivo com um parto de termo às 39+5SG.

4. Discussão

O DPN permite identificar anomalias fetais *in útero* durante a gestação. Atualmente baseia-se num rastreio que estratifica as gestações em graus de risco, alertando para aquelas que tenham maior risco para anomalias cromossómicas fetais. Para confirmação diagnóstica, é indicado que estas realizem testes invasivos para colheita de células nucleadas fetais que possibilitam o estudo do cariótipo.⁵⁻⁷ No entanto, sabe-se que o rastreio utilizado tem uma elevada taxa de falsos positivos, levando a que os testes de diagnóstico invasivos sejam propostos a um número elevado de grávidas cujos fetos são euploides.^{7,8,11}

O NIPT trouxe, pela primeira vez nas técnicas de diagnóstico pré-natal, a oportunidade de conhecer o genoma fetal através de um procedimento não invasivo que consiste na análise de cffDNA presente na circulação sanguínea materna. Além de ser uma técnica inócua que implica apenas uma punção venosa, o NIPT permite uma deteção mais fidedigna de patologias genéticas do feto comparativamente à estratificação de risco oferecida pelo RCPT atualmente utilizado. Assim, pelo menor número de falsos positivos, menos gestações sem aneuploidias fetais são sinalizadas para testes invasivos.^{4,11,23,28}

O estudo apresentado fez um levantamento de todas as grávidas que realizaram o teste pré-natal não invasivo por cffDNA no CHUCB desde fevereiro de 2016 até março de 2022, com um total de 197 gestações elegíveis após aplicados os critérios de exclusão necessários.

Através da caracterização da amostra, percebe-se que a maioria das mulheres que optaram por realizar NIPT têm mais de 35 anos (91.9%). Isto pode dever-se ao facto da amostra obtida estar incluída na população obstétrica que faz o acompanhamento da sua gravidez no hospital, correspondendo habitualmente a gestações de risco acrescido, o que foi também traduzido por 95.43% das gestações serem de alto risco. Sabendo que a idade materna avançada (>35 anos) é um dos fatores que aumenta o risco da gestação e que leva ao encaminhamento para consulta hospitalar, seria de esperar que a maior parte das gestações incluídas nesta amostra se encontrasse nessa faixa etária.

Por outro lado, 4.57% da amostra correspondeu a gestações gemelares, uma população em que o NIPT poderá ter particular interesse dado estar demonstrado terem um risco acrescido nos testes invasivos.¹³ Verificou-se ainda que 15.7% das grávidas que optaram por realizar NIPT conseguiram a gestação atual com recurso a técnicas de procriação medicamente assistida. Este é outro grupo que se compreende optar pelo NIPT em detrimento de testes invasivos na tentativa de evitar riscos que possam não ser essenciais, face à dificuldade e muitas vezes às tentativas repetidas para obter uma gravidez viável.

Relativamente ao tipo de NIPT que as gestantes preferem, verificou-se uma tendência para optar pelo teste mais básico da marca Harmony (47.2%), correspondendo ao teste mais

barato de entre as opções, e pelo teste mais completo da marca Trust (26.9%), que em oposição é a opção mais dispendiosa dos testes apresentados. Salienta-se, no entanto, que os testes da Trust foram introduzidos posteriormente aos da Harmony, em março de 2019. Estes resultados mostram que, embora o preço possa ser um fator que é tido em conta na decisão do teste NIPT, uma percentagem relevante de gestantes acabou por optar pelo teste mais completo e, por conseguinte, mais caro, o que demonstra preocupação e interesse em conhecer patologias fetais. Por outro lado, atribui-se o número reduzido de grávidas que realizaram o Prenatest à sua introdução mais tardia, em fevereiro de 2019, e à sua descontinuação em Portugal, tendo os últimos do CHUCB sido realizados em abril de 2021.

Sabe-se que vários fatores podem afetar a FF obtida no NIPT.²⁹⁻³⁶ O presente estudo procurou estabelecer uma associação entre os resultados discordantes obtidos pelo NIPT com as características maternas e da gestação que possam interferir com a FF. Constatou-se que, nestes casos, todas correspondiam a gestações únicas com RCPT de baixo risco. Observa-se que nos 3 falsos positivos as gestantes tinham idade superior a 35 anos. No entanto, sabendo que 91.9% da amostra tinha idade superior a 35 anos, este achado não pode ser valorizado. Apurou-se ainda que nos resultados verdadeiros negativos e verdadeiros positivos, a mediana do IMC das gestantes foi inferior a 24.90Kg/m², enquanto nos falsos positivos a mediana do IMC foi de 27.80Kg/m², correspondendo a gestantes com excesso de peso. Conhecendo-se a associação entre o excesso de peso materno e o aumento da proporção de ADN livre materno face à FF, poder-se-ia esperar que estes casos apresentassem uma FF reduzida, podendo este ser um fator precipitante dos resultados falsos positivos obtidos.^{29-31,33,35} Contudo, estatisticamente não se verificou uma associação significativa por serem números residuais na amostra. Salienta-se, por fim, que 2 dos 3 falsos positivos indicavam uma elevada probabilidade de T13 fetal, o que não se verificou, embora esteja demonstrado que a trissomia 13 tem taxas de falsos positivos superiores, pelo que este achado vai de encontro ao descrito na literatura.²⁸⁻³¹

No que concerne aos resultados indeterminados, todos tinham em comum as gestantes terem idades superiores a 35 anos, facto que pode ser explicado pelo motivo supracitado. Além disso, 3 dos 4 casos coincidiam ser gestações obtidas com recurso a técnicas de PMA. Sabe-se que estas tendem a apresentar FF menores comparativamente às gestações por conceção espontânea, um fator que contribui para que se obtenham resultados indeterminados.³⁶ Obteve-se ainda que 2 das 4 gestantes faziam terapêutica com heparina, o que poderá ter interferido com o resultado por reduzir os fragmentos de cfDNA.³⁰ Estes testes foram repetidos e verificou-se que não existiu nenhum caso de aneuploidia.

Passando à análise do desempenho do RCPT e do NIPT, salienta-se que neste estudo apenas foi possível considerar as principais aneuploidias, já que são as que todas as opções dos testes NIPT realizados incluem em comum.

A evidência sugere que o NIPT apresenta melhor sensibilidade e especificidade, e menos casos de falsos positivos para aneuploidias do que o RCPT.^{4,11,28} Na presente amostra, verificou-se que o NIPT efetivamente alcançou um desempenho superior no rastreio de aneuploidias comparativamente ao RCPT utilizado. As AUC geradas demonstraram que o RCPT teve uma capacidade discriminativa aceitável enquanto o NIPT conseguiu uma boa capacidade discriminativa na detecção destas cromossomopatias.

A primeira hipótese inferencial colocada postula que o NIPT poderia ser utilizado como método de rastreio pré-natal de primeira linha, substituindo com segurança o RCPT atualmente utilizado e que, conseqüentemente, permitiria diminuir o número de testes invasivos necessários.^{18,44-46} Para tal, importa considerar que na presente amostra, o NIPT foi capaz de detetar 3 dos 4 casos de aneuploidias fetais, comparando com os 2 casos detetados pelo RCPT. Aplicado à população geral, o NIPT apresentou melhor performance em todos os parâmetros comparativamente ao RCPT, incluindo maior sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

É ainda de realçar os falsos positivos obtidos pelo NIPT (1.52%) comparativamente ao RCPT (21.62%). Está demonstrado que o RCPT consegue atingir 5% FP, uma percentagem bastante menor do que a conseguida na presente amostra. Contudo, deve ser tido em conta que a seleção da amostra teve por base a realização de NIPT, sendo que estas gestações tinham uma média de idade materna aumentada (37 anos), bem como uma percentagem significativa de RCPT positivos (29.4%).⁹ Além disso, o limite utilizado na definição do grupo de risco intermédio foi um valor amplo, o que poderá também ter conduzido ao valor obtido.

Verificou-se que 32 gestações da amostra tinham critério para realizar amniocentese e, paralelamente, houve 6 casos de NIPT positivos na amostra total, incluindo uma gestação que já tinha indicação para amniocentese sem consideração do NIPT. Assim, o NIPT como teste de primeira linha permitiria diminuir de 14 para 6 as amniocenteses indicadas pelo rastreio de primeiro trimestre, correspondendo a uma redução de 57.14%. Além de ser uma diminuição significativa, permitiria evitar o teste invasivo em 92.5% dos casos em que o feto era euploide.

Desta forma, verifica-se que na presente amostra o NIPT poderia substituir com segurança o RCPT utilizado, com uma maior sensibilidade e especificidade para a detecção das três aneuploidias mais frequentes e um número significativamente menor de falsos positivos, diminuindo efetivamente o número de testes invasivos necessários. Salienta-se ainda que, utilizando o NIPT em substituição do rastreio combinado, o seu resultado deverá

ser tido em conta em conjunto com os achados ecográficos e a determinação da alfa-fetoproteína, de forma a possibilitar a deteção de outras complicações além das aneuploidias, tal como defeitos do tubo neural ou outras malformações fetais.^{10,20,33}

A segunda hipótese inferencial em análise é que o NIPT poderia ser utilizado como teste de rastreio pré-natal de segunda linha, em consequência de um RCPT de risco intermédio ou elevado, diminuindo o número de testes invasivos necessários.^{11,28} Verifica-se que na população com RCPT positivo o NIPT atingiu a sua melhor performance, com maior especificidade e valor preditivo positivo, e com igual valor preditivo negativo e sensibilidade atingida pelo NIPT aplicado à população geral. Ao mesmo tempo, esta estratégia permitiu não obter nenhum falso positivo.

Considerando as gestantes com RCPT positivo (n=42), pode verificar-se que apenas 2 casos correspondiam a aneuploidia, pelo que, se tivéssemos em conta apenas o RCPT, poderia ser sugerido estudo adicional através de um teste invasivo confirmatório a 40 grávidas com fetos euploides. Segundo as diretrizes da ISUOG, mesmo que destas apenas fosse proposta amniocentese às grávidas com RCPT de alto risco de aneuploidia, e segundo os limites atualmente em vigor, então 14 gestantes fariam o teste diagnóstico invasivo. Tendo em conta que estas 14 grávidas realizaram NIPT e apenas uma obteve resultado de elevada probabilidade para aneuploidia, então adotando o NIPT como segunda linha em casos de RCPT positivo apenas esta gestante realizaria amniocentese, que por sua vez viria a revelar ser um caso de T21. Esta opção permitiria assim diminuir o número de amniocenteses indicadas pelo resultado dos rastreios de 14 para apenas 1, correspondendo a uma redução de 92.86%. Pesa, no entanto, que nas restantes 13 gestações existia um caso de triploidia 69,XXX que não seria detetada, sendo esta uma limitação dos testes NIPT utilizados por não permitirem testar para todas as aneuploidias. Porém, sendo esta uma aneuploidia incompatível com a vida, e muitas vezes suspeitada por anomalias detetadas por ecografia, o NIPT não afetaria o desfecho desta gestação.

É por isso possível concluir que, através da utilização de NIPT na população com RCPT positivo, se poderia reduzir de forma substancial e segura o número de testes invasivos necessários pelos falsos positivos do RCPT. A partir desta análise, verifica-se que o teste NIPT quando utilizado como segunda linha num esquema sequencial, aplicado aos casos de RCPT positivo, apresenta a melhor performance e efetivamente permite diminuir o número de testes invasivos necessários.

Em suma, na população geral o NIPT detetou 3 dos 4 casos de aneuploidias e apresentou 3 falsos positivos, enquanto o NIPT dirigido à população com RCPT positivo alertou para 1 dos 2 casos de aneuploidias (sendo o restante não detetável por NIPT), sem casos de falsos positivos. Em ambas as situações, através do uso de NIPT quer na população geral, quer nos casos com RCPT positivo, não se obtiveram falsos negativos e atingiu-se a

mesma sensibilidade e valor preditivo negativo. Por sua vez, a especificidade e o valor preditivo positivo foram superiores quando o NIPT foi realizado na população com RCPT positivo, atingindo 100%. Apura-se também que a exatidão demonstrada pelo teste na segunda hipótese foi superior.

Relativamente a possíveis complicações resultantes dos testes diagnósticos invasivos, não se verificaram efeitos adversos na presente amostra em consequência destes procedimentos. Tal pode dever-se ao reduzido número de amniocenteses realizadas na amostra, bem como às boas práticas dos obstetras da unidade e cuidados adotados durante e após a técnica.

Por fim, salienta-se que em 75% dos casos em que foram diagnosticadas aneuploidias no período pré-natal, os progenitores optaram por realizar uma IMG. O caso com desfecho em nado-vivo corresponde ao Síndrome de Klinefelter, para o qual não é autorizada IMG exceto se na presença de malformações severas. Estes valores vão de encontro à proporção nacional que entre 2018–2019 correspondeu ao desfecho de 80.8% dos casos de anomalias cromossómicas em IMG.¹

5. Conclusão

Perante os resultados obtidos, e tendo em consideração apenas a deteção das aneuploidias compatíveis com a vida mais frequentes, o NIPT apresentou um desempenho superior ao RCPT, quer como rastreio de primeira linha, quer quando utilizado em segunda linha apenas nos casos de RCPT positivo. Por este motivo, a sua utilização traria sempre benefícios face ao rastreio atualmente implementado.

Contudo, quando utilizado em segunda linha após um RCPT positivo, o NIPT demonstrou ser superior na deteção de aneuploidias. Verificou-se uma maior sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e exatidão, atingindo 100%, comparativamente a 66.67%, 78.02%, 4.76%, 99.3% e 77.84% no RCPT isolado, respetivamente. Com esta associação dos dois métodos de rastreio, conseguiu-se reduzir para o número de falsos positivos no rastreio de aneuploidias do primeiro trimestre, o que permitiria uma diminuição de 92.86% nos testes invasivos necessários.

Assim, conclui-se que na população obstétrica do CHUCB o NIPT apresentaria mais vantagens se fosse introduzido como rastreio de segunda linha em esquema sequencial perante um RCPT positivo. Esta opção não comprometeria a deteção de aneuploidias e, simultaneamente, permitiria diminuir o número de testes invasivos necessários de forma significativa.

Dadas as limitações deste estudo, assume-se que esta conclusão poderá não ser extrapolável, devendo ser entendida no respetivo contexto e amostra analisada.

5.1 Limitações do estudo

As principais limitações deste estudo prendem-se com a dimensão da amostra, que veio mostrar ser reduzida face ao que era ambicionado, tanto em número de testes NIPT realizados como na baixa incidência de cromossomopatias, limitando as conclusões que podem ser retiradas desta investigação. Tal deve-se ao foco num teste com custos elevados suportados inteiramente pelos utentes, e por se enquadrar num hospital com um número reduzido de acompanhamento de gestações anual quando comparado com outros centros hospitalares. Por estes motivos, é possível que a amostra não seja representativa da população nacional e que possa existir viés na inferência de potenciais resultados e vantagens do NIPT. Ainda assim, conseguiu-se corroborar as hipóteses em estudo e obter conclusões aplicáveis à população do CHUCB.

No presente estudo podem também ser identificadas algumas limitações relacionadas com o seu carácter transversal retrospectivo.

Por ser um estudo retrospectivo, a obtenção de alguns dados foi impossibilitada. Nomeadamente, o desfecho da gravidez, o fenótipo à nascença e resultados de exames quando estes foram realizados noutras instituições. Em várias utentes o resultado do próprio RCPT não está disponível para consulta por ser anexado ao processo clínico eletrónico e não integrado no mesmo como os exames realizados no CHUCB. A obtenção do resultado dos testes NIPT esteve também limitado ao seu registo em contexto de consulta, já que por não ser analisado no CHUCB não é possível consultar o respetivo relatório.

Pesa ainda um possível viés de informação pelo desenho transversal deste estudo, já que a recolha de informação baseada em registos passados elaborados por terceiros nos processos clínicos pode ter implicações na causalidade e associações encontradas. Pelo uso do Boletim de Saúde da Grávida no contexto de consultas, é possível que haja dados que foram recolhidos mas registados neste documento em vez do processo clínico eletrónico, limitando os dados que estão acessíveis para consulta e consequentemente a obtenção da totalidade das informações necessárias a este estudo.

Finalmente, existe um possível viés por, na inexistência de cariótipo, se ter considerado a ausência de características fenotípicas como representativo de euploidia, o que em alguns casos se assuma que possa não ser equiparável.

Considera-se, no entanto, que a amostragem e metodologia utilizadas foram adequadas e que foram adotadas medidas para a obtenção de conclusões válidas para a população obstétrica do CHUCB.

5.2 Linhas futuras de investigação

Este estudo incluiu apenas a população de grávidas do CHUCB, podendo ser uma amostra pouco representativa da população portuguesa. Por este motivo, e sendo o NIPT um teste que já demonstrou resultados tão promissores, seria interessante expandir a investigação para a realidade nacional.

Outras linhas de investigação poderiam ser desenhadas, trazendo dados de interesse para a discussão sobre a adoção do NIPT: uma comparando a performance do NIPT com o do rastreio integrado do 1º e 2º trimestres; outra com um grupo controlo a quem sejam aplicados os métodos de rastreio atualmente implementados e comparar os resultados com o grupo em estudo que tenha realizado NIPT sem consideração do RCPT, ou aplicado apenas às gestações com um RCPT de risco elevado e intermédio. Seria também de relevo o desenvolvimento de estudos de custo-efetividade e custo-benefício destas estratégias.

A continuação do estudo da aplicação do NIPT à população portuguesa através de investigações futuras poderá trazer conclusões interessantes para uma possível inclusão do NIPT como rastreio implementado pelo SNS.

6. Referências Bibliográficas

1. Braz P, Machado A, Roquette R, Dias CM. Registo Nacional de Anomalias Congénitas: Relatório 2018-2019. Lisboa; 2021.
2. Ministério da Saúde. Despacho n.º 5411-97, de 6 de agosto. Diário da República. 1997;2ª Série(180):9509-10.
3. Kotsopoulou I, Tsoplou P, Mavrommatis K, Kroupis C. Non-invasive prenatal testing (NIPT): Limitations on the way to become diagnosis. *Diagnosis*. 2015;2(3):141-58.
4. LeFevre NM, Sundermeyer RL. Fetal Aneuploidy: Screening and Diagnostic Testing. *American Family Physician*. 2020;101(8):481-8.
5. Direção-Geral de Saúde. Programa Nacional para a Vigilância da Gravidez de Baixo Risco. Ministério da Saúde. 2016;1-9.
6. Direção-Geral de Saúde. Exames ecográficos na gravidez de baixo risco. 023/2011 Portugal; 2013 p.1-9.
7. Robinson C, van den Boom D, Bombard AT. Noninvasive prenatal detection of aneuploidy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2014;57(1):210-25.
8. Alldred SK, Takwoingi Y, Guo B, Pennant M, Deeks JJ, Neilson JP, et al. First trimester serum tests for Down's syndrome screening. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2015 Nov 30;2015(11). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD011975>
9. Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, et al. First-Trimester or Second-Trimester Screening, or Both, for Down's Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(19):2001-11.
10. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine* [Internet]. 2016 Oct;18(10):1056-65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021044488>
11. Badeau M, Lindsay C, Blais J, Nshimyumukiza L, Takwoingi Y, Langlois S, et al. Genomics-based non-invasive prenatal testing for detection of fetal chromosomal aneuploidy in pregnant women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2017 Nov 10;2017(11). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD011767.pub2>
12. Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfirevic Z, et al. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2016 Aug;48(2):256-68. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.15945>

13. Navaratnam K, Alfirevic Z, the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Amniocentesis and chorionic villus sampling. Green-top Guideline no. 8. BJOG [Internet]. 2022 Jan 24;129(1):e1–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0528.16821>
14. Alfirevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2017 Sep 4 ;2017(9). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003252.pub2>
15. Wilson RD, Gagnon A, Audibert F, Campagnolo C, Carroll J, Brock JA, et al. Prenatal Diagnosis Procedures and Techniques to Obtain a Diagnostic Fetal Specimen or Tissue: Maternal and Fetal Risks and Benefits. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada [Internet]. 2015;37(7):656–68. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30205-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30205-X)
16. 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 & Gynecology [Internet]. 2015 Jan 2;45(1):16–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.14636>
17. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350(9076):485–7.
18. Iwarsson E, Jacobsson B, Dagerhamn J, Davidson T, Bernabé E, Heibert Arnlin M. Analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood for detection of trisomy 21, 18 and 13 in a general pregnant population and in a high risk population - a systematic review and meta-analysis. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica [Internet]. 2017 Jan;96(1):7–18. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aogs.13047>
19. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, et al. Non-invasive prenatal testing: A review of international implementation and challenges. International Journal of Women's Health [Internet]. 2015;7:113–26. Available from: <https://doi.org/10.2147/IJWH.S67124>
20. SMFM. #36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. American Journal of Obstetrics and Gynecology [Internet]. 2015 Jun;212(6):711–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.03.043>
21. Audibert F, de Bie I, Johnson JA, Okun N, Wilson RD, Armour C, et al. No. 348-Joint SOGC-CCMG Guideline: Update on Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy, Fetal Anomalies, and Adverse Pregnancy Outcomes. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada [Internet]. 2017 Sep;39(9):805–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jogc.2017.01.032>
22. Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. Human Genetics [Internet]. 2005 Jul 20;

- 117(2–3):243–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-005-1330-z>
23. Health Quality Ontario. Perspectives of Pregnant People and Clinicians on Noninvasive Prenatal Testing: A Systematic Review and Qualitative Meta-synthesis. [Internet]. Vol.19, Ontario health technology assessment series. 2019. Available from: <http://www.hqontario.ca/evidence-to-improve-care/journal-ontario-health-technology-assessment-series>
 24. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2015 Mar;45(3):249–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.14791>
 25. Geppert J, Stinton C, Johnson S, Clarke A, Grammatopoulos D, Taylor-Phillips S. Antenatal screening for fetal trisomies using microarray-based cell-free DNA testing: A systematic review and meta-analysis. *Prenatal Diagnosis* [Internet]. 2020 Mar;40(4):454–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.5621>
 26. Stumm M, Entezami M, Haug K, Blank C, Wüstemann M, Schulze B, et al. Diagnostic accuracy of random massively parallel sequencing for non-invasive prenatal detection of common autosomal aneuploidies: a collaborative study in Europe. *Prenatal Diagnosis* [Internet]. 2014 Feb;34(2):185–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.4278>
 27. Kotsopoulou I, Tsoplou P, Mavrommatis K, Kroupis C. Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis. *Diagnosis* [Internet]. 2015 Sep 1;2(3):141–58. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/dx-2015-0002/html>
 28. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2017 Sep;50(3):302–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.17484>
 29. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2016 Jun;47(6):698–704. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.15851>
 30. Samura O, Okamoto A. Causes of aberrant non-invasive prenatal testing for aneuploidy: A systematic review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet]. 2020 Jan;59(1):16–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.11.003>
 31. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2013

- Jan;41(1):26-32. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.12331>
32. 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>
 33. Poon LCY, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal Plasma Cell-Free Fetal and Maternal DNA at 11-13 Weeks' Gestation: Relation to Fetal and Maternal Characteristics and Pregnancy Outcomes. *Fetal Diagnosis and Therapy* [Internet]. 2013;33(4):215–23. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/346806>
 34. Galeva S, Gil M del M, Konstantinidou L, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2019 Apr 11;53:804–9. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.20290>
 35. Haghiac M, Vora NL, Basu S, Johnson KL, Presley L, Bianchi DW, et al. Increased Death of Adipose Cells, a Path to Release Cell-Free DNA Into Systemic Circulation of Obese Women. *Obesity* [Internet]. 2012 Nov;20(11):2213–9. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2012.138>
 36. Lee TJ, Rolnik DL, Menezes MA, McLennan AC, da Silva Costa F. Cell-free fetal DNA testing in singleton IVF conceptions. *Human Reproduction* [Internet]. 2018;33(4):572-8. Available from:
<https://academic.oup.com/humrep/article/33/4/572/4859693>
 37. He Y, Wang Y, Li Z, Chen H, Deng J, Huang H, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13 in twin pregnancies: A cohort study and a systematic meta-analysis. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* [Internet]. 2020 Jun 9;99(6):731–43. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aogs.13842>
 38. Mackie F, Hemming K, Allen S, Morris R, Kilby M. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* [Internet]. 2017 Jan;124(1):32–46. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0528.14050>
 39. Martin K, Iyengar S, Kalyan A, Lan C, Simon AL, Stosic M, et al. Clinical experience with a single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal test for five clinically significant microdeletions. *Clinical Genetics* [Internet]. 2018 Feb;93(2):293–300. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.13098>

40. Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S, et al. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* [Internet]. 2019 Dec 14;17(1):37. Available from: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1254-4>
41. Zhu Y juan, Zheng Y ru, Li L, Zhou H, Liao X, Guo J xin, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive fetal RhD genotyping using cell-free fetal DNA: a meta analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [Internet]. 2014 Dec;27(18):1839-44. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2014.882306>
42. Runkel B, Bein G, Sieben W, Sow D, Polus S, Fleer D. Targeted antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative pregnant women: a systematic review. *BMC Pregnancy and Childbirth* [Internet]. 2020 Dec 7;20(1):83. Available from: <https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-020-2742-4>
43. Mardy AH, Norton ME. Diagnostic testing after positive results on cell free DNA screening: CVS or Amnio? *Prenatal Diagnosis* [Internet]. 2021 Sep 25;41(10):1249–54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.6021>
44. Mersy E, Smits LJM, van Winden LAAP, de Die-Smulders CEM, Paulussen ADC, Macville MVE, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. *Human Reproduction Update* [Internet]. 2013 Jul 1;19(4):318–29. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article/19/4/318/609448>
45. Mersy E, de Die-Smulders CEM, Coumans ABC, Smits LJM, de Wert GMWR, Frints SGM, et al. Advantages and disadvantages of different implementation strategies of non-invasive prenatal testing in down syndrome screening programmes. *Public Health Genomics*. 2015;18(5):260–71.
46. Kagan KO, Sroka F, Sonek J, Abele H, Lüthgens K, Schmid M, et al. First-trimester risk assessment based on ultrasound and cell-free DNA vs combined screening: a randomized controlled trial. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2018 Apr;51(4):437-44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.18905>
47. Manegold-Brauer G, Kang B, Hahn S, De G, Buechel J, Hoesli I, et al. A new era in prenatal care: non-invasive prenatal testing in Switzerland. *Swiss Medical Weekly* [Internet]. 2014 Feb 4;144(February):1–5. Available from: <http://doi.emh.ch/smw.2014.13915>
48. Friel L, Czerwinski J, Singletary C. The Impact of Noninvasive Prenatal Testing on the Practice of Maternal–Fetal Medicine. *American Journal of Perinatology* [Internet]. 2013 Dec 11;31(09):759–64. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1359717>

49. Larion S, Warsof SL, Romary L, Mlynarczyk M, Peleg D, Abuhamad AZ. Uptake of noninvasive prenatal testing at a large academic referral center. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet]. 2014;211(6):651.e1-651.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.06.038>
50. Wax JR, Cartin A, Chard R, Lucas FL, Pinette MG. Noninvasive Prenatal Testing: Impact on Genetic Counseling, Invasive Prenatal Diagnosis, and Trisomy 21 Detection. *Journal of Clinical Ultrasound*. 2015;43(1):1–6.
51. Gadsbøll K, Petersen OB, Gatinois V, Strange H, Jacobsson B, Wapner R, et al. The NIPT-map Study Group. Current use of noninvasive prenatal testing in Europe, Australia and the USA: A graphical presentation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* [Internet]. 2020;99(6):722–30. Available from: <https://doi.org/10.1111/aogs.13841>
52. Perrot A, Horn R. The ethical landscape(s) of non-invasive prenatal testing in England, France and Germany: findings from a comparative literature review. *European Journal of Human Genetics* [Internet]. 2021;1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41431-021-00970-2>
53. The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. The Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee. Committee Opinion No. 545. Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidy. *Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2012;120:1532–4. Available from: http://www.acog.org/Resources_And_Publications/Committee_Opinions/Committee_on_Genetics/Noninvasive_Prenatal_Testing_for_Fetal_Aneuploidy
54. Chitty L, Cameron L, Daley R, Fisher J, Hill M, Jenkins L, et al. RAPID Non-invasive prenatal testing (NIPT) evaluation study: Executive summary [Internet]. 2015. Available from: <https://legacyscreening.phe.org.uk/fetalanomalies%0Apapers3://publication/uuid/8FC28833-0B06-4A66-ACD3-2CBC9D24B270>
55. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression* [Internet]. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. 160–164 p. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471722146>

7. Anexos

7.1 ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira



IMPRESSO

Parecer da Comissão de Ética para a Saúde

Código: CHUCB.IMP.COMET.01

Edição: 5

Revisão: 1

Parecer nº: 09/2022	Data: 2022-02-16
Assunto: Estudo nº 04/2022 - "A eficácia do teste pré-natal não invasivo (NIPT Cell-free DNA): a experiência do CHUCB"	

Membros da CE do CHUCB:

Prof. Doutor Manuel Passos Morgado
(Presidente, Farmacêutico)

Dra. Ana Paula Torgal Carreira
(Vice-Presidente, Assistente Social)

Dr. Luís Manuel Ribeiro
(Médico)

Enf. Maria Gabriela Ramalinho
(Enfermeira)

Dra. Maria Teresa Bordalo Santos
(Psicóloga)

Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro
(Jurista)

Dr. António Luciano Costa
(Teólogo)

Exma. Senhora Investigadora:
Ana Filipa da Silva Clemente

A Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, em reunião realizada em 2022-02-16, deliberou emitir parecer relativamente à realização do Estudo nº 04/2022 - "A eficácia do teste pré-natal não invasivo (NIPT Cell-free DNA): a experiência do CHUCB"

Membros da CES do CHUCB presentes:

Prof. Doutor Manuel Passos Morgado
Dra. Ana Paula Torgal Carreira
Enfª Maria Gabriela Ramalinho
Dra. Maria Teresa Bordalo Santos
Dr. Luís Manuel Ribeiro
Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro

Parecer:

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 04/2022 “A eficácia do teste pré-natal não invasivo (NIPT Cell-free DNA): a experiência do CHUCB” que:

- 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.

Foram verificadas as condições acima descritas autorizando-se a realização do estudo e solicitando-se ao Serviço de Gestão de Produção e Apoio ao Planeamento – GEPI que forneça os dados relativos a todas as grávidas seguidas no Hospital Pêro da Covilhã, na consulta de diagnóstico pré-natal ou de acompanhamento de gravidez, a quem tenha sido proposto o teste NIPT ou amniocentese após rastreio bioquímico de moderado e alto risco desde 2016 até ao momento, à Dra Nélia Lamberta Pereira Rodriguez ou Dra Fernanda Taliberti Pereto Meyer, médicas a exercer no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira.

Data: 28/02/2022

EPD

RAI

Responsável pelo Acesso à Informação
CHUCB, E.P.E.



Centro Hospitalar 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@chcbeira.min-saude.pt www.chcbeira.pt

1/2