

RASTREIO PRÉ-NATAL

NOVOS DESENVOLVIMENTOS

Maria José Rego de Sousa

Patologista Clínica

Assistente Graduada de Patologia Clínica-Hospital Fernando Fonseca

Responsável da Secção de Imunologia Especial

RASTREIO PRÉ-NATAL

Conjunto de actividades pré-natais que têm por objectivo o diagnóstico de um defeito ou malformação congénita,

- Prevenção
- **Rastreio Pré-Natal**
- Diagnóstico pré-natal invasivo (Amniocentese/CVS)
- Prognóstico
- Terapêutica/conduita
- Follow-up

RASTREIO PRÉ-NATAL

Um teste rastreio pré-natal ideal deveria...

- Poder ser usado no início da gravidez
- Não implicar qualquer risco para a gravidez
- Detectar 100% dos casos de T21, T18, T13
- Não originar falsos positivos nem falsos negativos.

NOTAS HISTÓRICAS

ANO	MÉTODO	TAXA (%)
1970	Idade Materna (>40a; >35a)	30
1984	Idade Materna (IM) + AFP + hCGt	55 - 60
1988	Teste Triplo (2ºT) (IM+AFP+hCGt+uE3)	60 - 65
1990	Rastreio 1º T (PAPP-A + fβhCG)	60 - 70
1995	Rastreio Combinado 1º T (IM+NT+NB+PAAP-A+fβhCG)	95 - 97
1996	Teste Quadrúplo (2ºT) (AFP+hCGt+uE3+Inibina-A)	67 - 76
1999	Teste Integrado (1ºT e 2ºT)	90 - 94

Método de rastreio	Taxa de detecção (%)	Taxa de Falsos Positivos (%)
IM	30	5
1º Trimestre		
IM + TN fetal	75-80	5
IM + β -hCG livre e PAPP-A soro	60-70	5
IM + TN+ β -hCG livre e PAPP-A soro (Combinado)	85-95	5
Combinado + ON ou v. tricúspide ou DV	93-96	2.5
2º Trimestre		
MA + serum AFP, hCG (teste duplo)	55-60	5
MA + serum AFP, β -hCG livre (teste duplo)	60-65	5
MA + serum AFP, hCG, uE ₃ (teste triplo)	60-65	5
MA + serum AFP, β -hCG livre, uE ₃ (teste triplo)	65-70	5
MA + serum AFP, hCG, uE ₃ , inibina A (teste quadrúplo)	65-70	5
MA + serum AFP, β -hCG livre, uE ₃ , inibina A (teste quadrúplo)	70-75	5
IM + TN + PAPP-A (11–13 weeks) + teste quadrúplo	90-94	5

RASTREIO PRÉ-NATAL

Avaliação do grau de risco para existência de

- S. Down (T21) - 1:1000 (12); 1:1500 (40)
- S. Edwards (T18) - 1:2500 (12); 1:18000 (40)
- S. Patau (T13) - 1:8000 (12); 1:42 000 (40)
- S. Turner (45X0) – 1:1500 (12); 1:4000 (40)
- S. Klinefelter (47XXY) (1:500)
- S. Triplo X (47XXX) (1:500)
- S. Jacob (47XYY) (1:500)
- Triploidias (1:2000)
- Poliploidias
- Desfechos adversos da Gravidez (RCF; PPT; PE)

Recomendações DGS

NORMA DA DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE

ASSUNTO: Exames Ecográficos na Gravidez

Francisco
Henrique
Moura
George

Digitally signed by
Francisco Henrique Moura
George
DN: c=PT, o=Ministério da
Saúde, ou=Direção-Geral
da Saúde, cn=Francisco
Henrique Moura George
Date: 2011.10.10 15:45:23
+0100'

1899-2011
111 anos

Direção-Geral da Saúde
www.dgs.pt



Ministério da Saúde

NÚMERO: 023/2011

DATA: 29/09/2011

NORMA DA DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE

ASSUNTO: Exames Ecográficos na Gravidez de baixo risco

Francisco
Henrique
Moura
George

Digitally signed by Francisco
Henrique Moura George
DN: c=PT, o=Ministério da
Saúde, ou=Direção-Geral
da Saúde, cn=Francisco
Henrique Moura George
Date: 2013.05.21 14:42:10
+0100'

1899-2011
113 anos

Direção-Geral da Saúde
www.dgs.pt



Ministério da Saúde



NÚMERO: 023/2011

DATA: 29/09/2011

ATUALIZAÇÃO: 21/05/2013

NORMA

DA DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE

Francisco
Henrique
Moura
George

Digitally signed by Francisco
Henrique Moura George
DN: c=PT, ou=Ministério da
Saúde, ou=Direção-Geral
de Saúde, cn=Francisco
Henrique Moura George
Date: 2013.05.21 14:42:40
+0100

113
anos

Direção-Geral da Saúde
www.dgs.pt
Ministério da Saúde



NÚMERO:	023/2011
DATA:	29/09/2011
ATUALIZAÇÃO:	21/05/2013

ASSUNTO: **Exames Ecográficos na Gravidez de baixo risco**

IV - FUNDAMENTAÇÃO

- A. A ecografia realizada entre as 11 e as 13 semanas e seis dias tem como objetivos: confirmar a viabilidade fetal, determinar o número de fetos e corionicidade, datar corretamente a gravidez, diagnosticar malformações *major* e contribuir para a avaliação do risco de aneuploidias¹.
- C. Os resultados da mais recente investigação em diagnóstico pré-natal permitem reconhecer que a idade materna, considerada isoladamente, é um mau indicador de risco de trissomia 21 e que é possível através de exame ecográfico, aplicando critérios padronizados internacionalmente, nomeadamente pela medição da translucência da nuca, calcular com fiabilidade o risco individual desta aneuploidia².

NORMA

DA DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE

Francisco
Henrique
Moura
George

Digitally signed by Francisco
Henrique Moura George
DN: c=PT, ou=Ministério da
Saúde, ou=Direção-Geral
de Saúde, cn=Francisco
Henrique Moura George
Date: 2013.05.21 14:42:40
+0100

199-2013
113 anos

Direção-Geral da Saúde
www.dgs.pt

Ministério da Saúde



NÚMERO:	023/2011
DATA:	29/09/2011
ATUALIZAÇÃO:	21/05/2013

ASSUNTO: Exames Ecográficos na Gravidez de baixo risco

IV - FUNDAMENTAÇÃO

D. O cumprimento dos critérios referidos na presente Norma é considerado como condição indispensável para reduzir o número de técnicas invasivas desnecessárias e atingir resultados significativos na aplicação do rastreio pré-natal de trissomia 21, nomeadamente: taxas de deteção de 80%, com 5% de falsos positivos³. A associação da medição da translucência da nuca e dos parâmetros bioquímicos (β -hCG, gonadotrofina coriónica humana, e PAPP-A, proteína A plasmática associada à gravidez) aumenta a taxa de deteção para 85-95%, com 5% de falsos positivos².



- No rastreio de 1º trimestre deve ser utilizada a TN e testes séricos que sejam mais eficazes que a TN *de per si*
- Treino específico, padronização, utilização de equipamento ecográfico adequado e avaliação externa, são importantes para atingir medições de TN óptimas para avaliação de risco para S. Down e estes procedimentos devem ser limitados a centros que cumprem os requisitos e atingem estes critérios

"Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities," Janeiro 2007 in *Obstetrics & Gynecology*.

NICE 2008 e 2011

"Deve ser oferecido, para o rastreio do síndrome de Down, o “teste combinado”, entre as 11⁺⁰ dias e as 13⁺⁶ semanas"

"Deve ser oferecido o rastreio a todas as mulheres, utilizando um teste com taxa de detecção superior a 75% e taxa de falsos positivos inferior a 3%; estas medidas de desempenho devem ser padronizadas"



*UK National Screening
Committee*

**Fetal Anomaly Screening Programme - Screening for Down's Syndrome:
UK NSC Policy recommendations 2007 – 2010: Model of Best Practice**

- A detection rate (DR) for Down's syndrome of greater than 75% of affected pregnancies with a screen positive rate (SPR) of less than 3%.

(Benchmark timeframe: April 2007 to April 2010)

- A detection rate (DR) of greater than 90% of affected pregnancies with a screen positive rate (SPR) of less than 2%.

(Benchmark timeframe: by April 2010)

10. **1st Trimester Combined** – This should be the preferred method to aid early diagnosis. This is the preferred method as it supports screening being completed in one stage without the need for more than one attendance. It will also give a risk before 14 weeks of pregnancy allowing earlier decision making

Rastreo Combinado do 1º Trimestre

Efectuado entre 11⁺⁰ e 13⁺⁶ semanas

- **Exame Bioquímico**

- Forma livre da subunidade β da hCG
- Proteína Plasmática A Associada á Gravidez

- **Exame Ecográfico**

- Comprimento crânio-caudal (CCC ou CRL)
- Translucência da Nuca (TN)
- Osso Nasal (ON)

Rastreio Combinado do 1º Trimestre

- **β -hCG livre**
 - Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG) - Glicoproteína placentar (subunidade α e β)
 - Menos de 1 % da subunidade β existe na forma livre.
- MoM's para fetos não afectados é de 1.0
- As MoM's são 1.9 (T21) e 0.18 (T18 e T13)

Rastreio Combinado do 1º Trimestre

- **PAPP-A**
 - Proteína Plasmática A Associada á Gravidez A é produzida pelo trofoblasto placentar.
 - Está significativamente reduzido no soro das mulheres com fetos com T21 e T18
- MoM's para fetos não afectados é de 1.0
- As MoM's são 0.44 (T21) e 0.32 (T18)

Rastreo Combinado do 1º Trimestre

Comprimento Crânio-Caudal (CCC)

Esta medição pode ser feita entre as 7 e as 13 semanas e permite uma estimativa muito exata da idade gestacional. A datação utilizando o CCC apresenta uma variação de 3-4 dias em relação ao último período menstrual.



Rastreio Combinado do 1º Trimestre

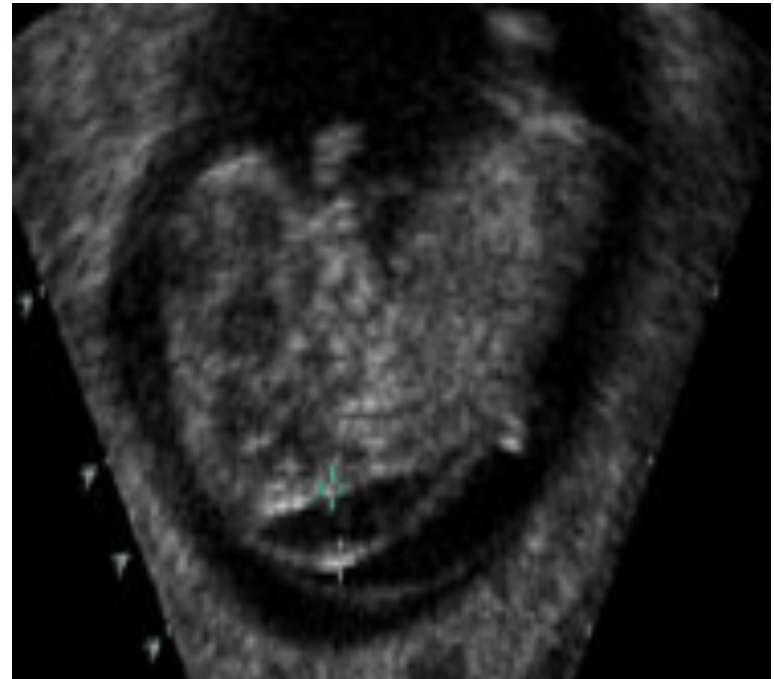
- **Translucência da Nuca (TN)**

Espaço não ecogénico situado entre a pele e os tecidos moles localizado ao nível da coluna cervical, e que apenas está presente no 1º trimestre da gravidez.

A TN está aumentada:

- Anomalias cromossómicas
- Defeitos cardíacos
- Síndromas genéticos
- Risco perinatal.

A TN só pode ser medida entre os 45 e 84 mm de CCC



Rastreo Combinado do 1º Trimestre

- **Ossos Nasal (NB)**

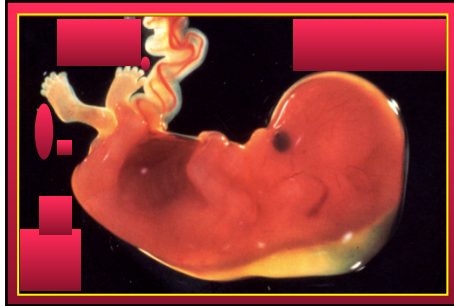
Protocolo de avaliação:

- Entre 11⁺⁰ e as 13⁺⁶
- CCC - 42 mm
- Cabeça e o tórax superior no ecrã
- Visualizar o osso nasal separadamente da pele do nariz
- A ecogenecidade do osso nasal deve ser maior do que a da pele sobreposta

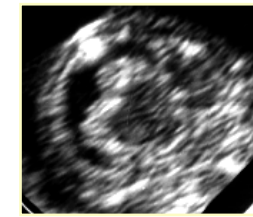
O Osso Nasal ausente em 73% das trissomias 21



One Stop Clinic for Assessment of Risk



	NT	CRL	FHR	β -hCG	PAPP-A
Trisomy 21	↑ 2.5	↔	↑	↑ 2.2	↓ 0.5
Trisomy 18	↑ 3.5	↓	↓	↓ 0.3	↓ 0.2
Trisomy 13	↑ 2.5	↔	↑	↓ 0.5	↓ 0.3
Turner's	↑ 7.0	↔	↑	↔	↓ 0.5
Triploidy	↑ 2.5	↔	↓	↑ 8.0	↓ 0.8
Triploidy	↔	↓	↓	↓ 0.2	↓ 0.1



Spencer & Nicolaides et al, 1999-2002

Rastreo Combinado 1º Trimestre

Requisitos de Certificação para Laboratórios

The Fetal Medicine Foundation

Downs Screening at 11-13⁺⁶ Weeks

FMF Certification of Biochemical Laboratories

The requirements for certification are:

- Compliance with the FMF Good Laboratory Guidelines (see below) and a signed Declaration of Conformity to the GLP guidance.
- Satisfactory laboratory Standard Operating Procedure (SOP) for prenatal screening.
- Your UKNEQAS Laboratory number. This is to confirm satisfactory participation and monitoring of your ongoing performance; it will be kept solely by the FMF Director of Biochemical Screening (Dr Kevin Spencer) and will not be given to any other person inside or outside of the FMF.

Once we have all of this information and it is acceptable then we can proceed to Interim Certification of your Laboratory, including the FMF Certificate and provide the FMF software if this is needed. Full certification is conditional on the demonstration of acceptable audit results after six months. Continued certification depends on acceptable external quality assurance performance and participation in an annual FMF audit.

Recommendations for good laboratory practice

Laboratory registration

Navigation Menu:

- Introduction
- 11-13⁺⁶ weeks scan book (multiple languages)
- Nuchal translucency
- Fetal nasal bone
- Fetal tricuspid regurgitation
- Patient information
- Certification in the 11-13⁺⁶ weeks scan
- Sybase license fee (software) online payment
- Accredited sonographers
- Registered NT centres
- Registered laboratories
- Registered software

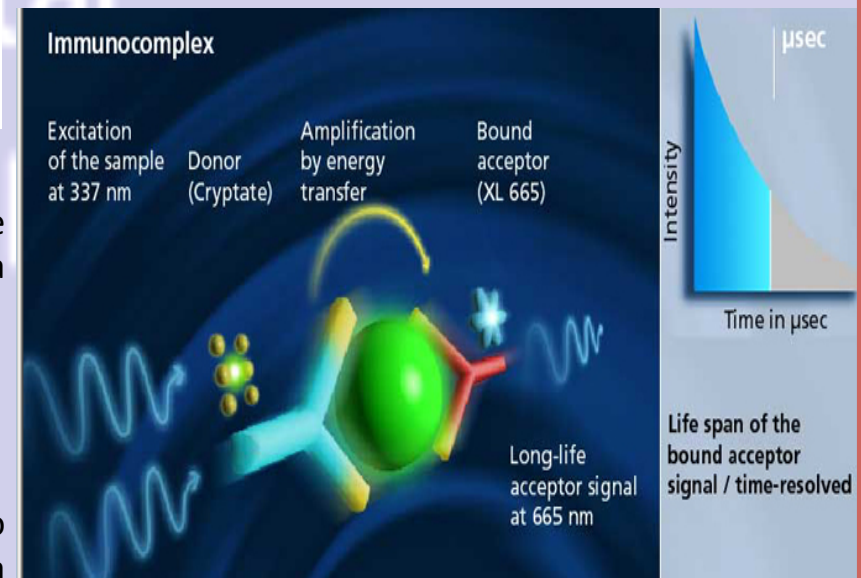
... Utilizar o KRYPTOR e reagentes KRYPTOR para Free β -hCG e PAPP-A (ou qualquer outro instrumento e reagentes que sejam aprovados pela FMF-UK)...



Vantagens:

- **Medição exacta da concentração de analito:** O sinal de longa vida útil é proporcional à concentração de analito a ser medido.
- **Elevada Reproducibilidade: CV < 3%**
- **Elevada minimização de interferências:** Sinais não específicos são eliminados pelo atraso temporal da medição de fluorescência.

Tecnologia de **TRACE (Time-Resolved-Amplified-Cryptate Emission)**: mede o sinal que é emitido a partir de um imunocomplexo, após atraso temporal.



PAPP-A e F β -hCG: Precisão intra-ensaio

Kryptor (quadruplicado)

	Mean	CV%
PAPP-A GM1	0.31	1.61
PAPP-A GM2	1.44	0.69
PAPP-A GM3	3.97	0.76
F β -hCG GM1	85.99	0.62
F β -hCG GM2	20.11	0.75
F β -hCG GM3	8.39	1.31

Spencer (2003) Ann Clin Biochem 40;166-8

DPC Imm 2000

	Mean	CV%
PAPP-A Q1	0.378	3.17
PAPP-A Q2	1.193	4.70
PAPP-A Q3	6.078	2.81
F β -hCG Q1	68.41	3.41
F β -hCG Q2	17.99	3.23
F β -hCG Q3	6.67	3.53

Spencer (2004) DPC Clinical Trials Report & Spencer (2005)

Impacto do Erro Analítico (intra-ensaio)

Único marcador

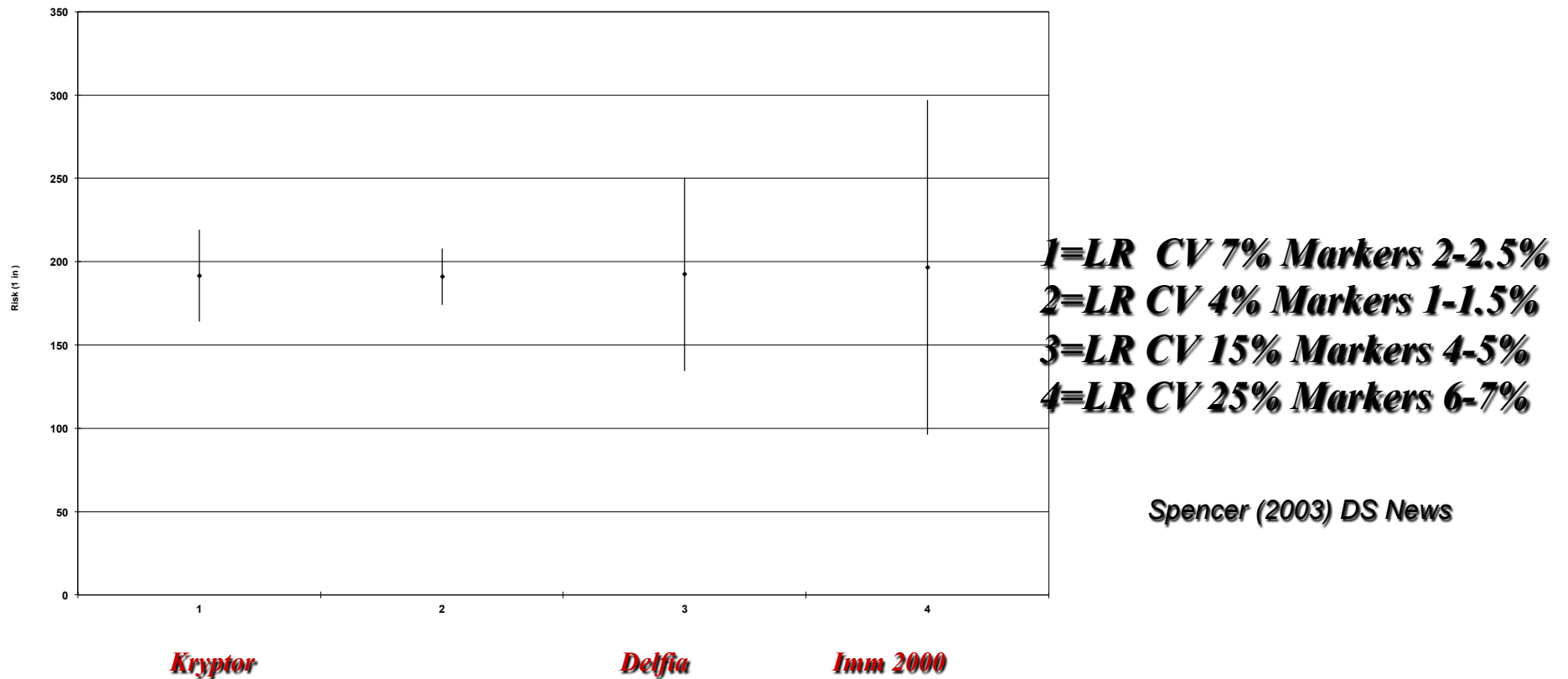
Marker	MoM	Error CV%	LR	% CV of LR	Risk 95% Range
F β -hCG	2.00	1	0.538	2.24	239-261
F β -hCG	2.00	3	0.539	6.63	217-284
PAPP-A	0.50	1	0.593	2.30	263-289
PAPP-A	0.50	3	0.594	6.86	238-317

Dois marcadores

Marker	MoM	Error CV%	LR	% CV of LR	Risk 95% Range
F β -hCG/PAPP-A	2.00/0.50	1	0.243	3.67	263-305
F β -hCG/PAPP-A	2.00/0.50	3	0.244	10.9	223-347

Influência da precisão analítica no intervalo de confiança do risco

F β -hCG=2.50MoM; PAPP-A 0.55MoM; NT 2.2mm; CRL 55mm; Age 24y



MEDIDAS DE DESEMPENHO

Rastreio Combinado 1º T (IM+NT+NB+PAAP-A+fβhCG)

95 - 97 %

Elevados falsos positivos

Os testes de rastreio referidos podem ter até 5% de taxa de falsos positivos

Preocupações com a segurança da gravidez

A amniocentese e a BVC têm 1% de risco de aborto

Elevados falsos positivos

Condicionam elevados níveis de ansiedade a muitas grávidas

Preocupações com a segurança da gravidez

Muitas mulheres receiam perder o seu feto como resultado de um teste invasivo

NOVOS DESENVOLVIMENTOS

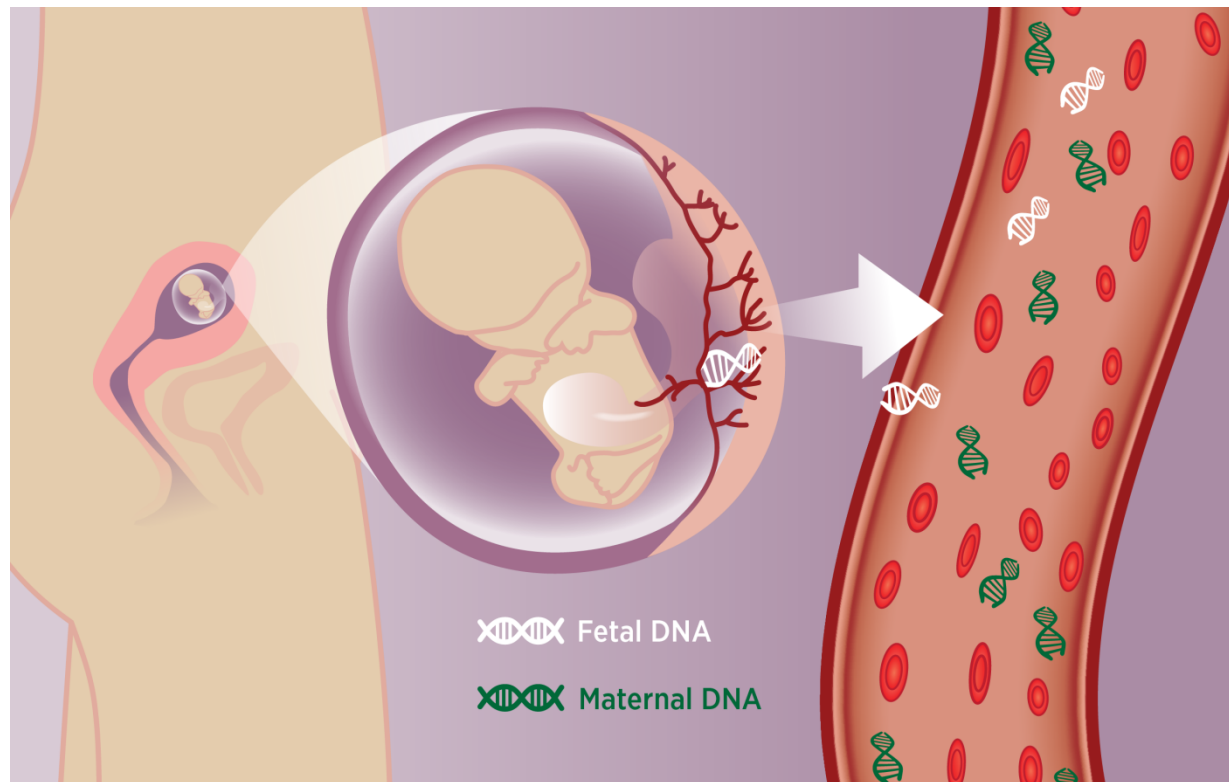


Noninvasive Prenatal Testing (NIPT):

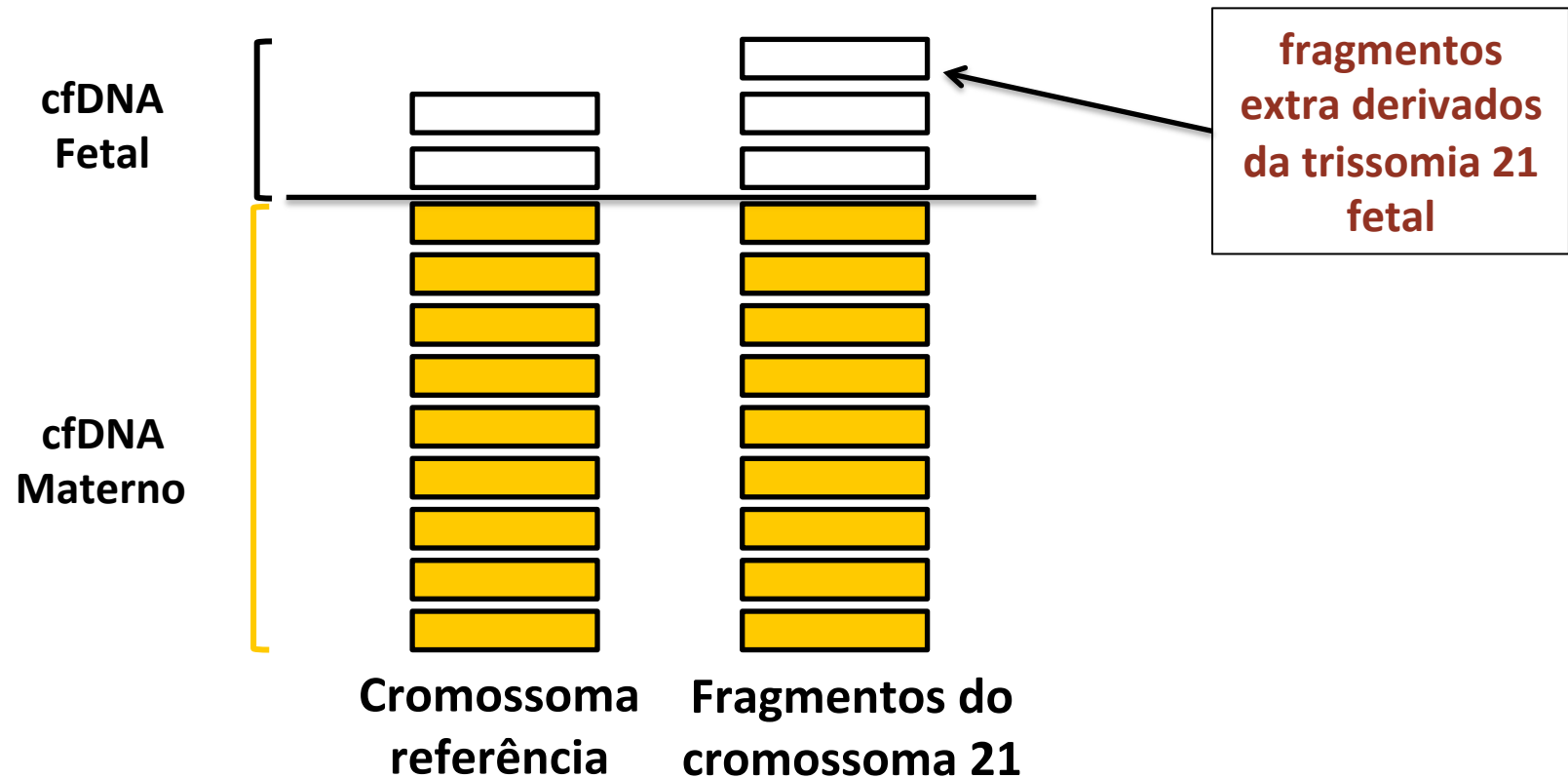
Uma Nova era na deteção das trissomias fetais

DNA livre circulante no sangue materno

- DNA livre circulante fetal (cffDNA) são pequenos fragmentos de DNA
- Na gravidez, existe cfDNA da mãe e do feto no sangue materno
- A quantidade de cffDNA é uma pequena fracção do cfDNA materno



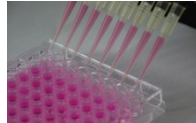
Detecção de trissomia fetal com o cfDNA



- * Cada barra representa milhares de fragmentos de cfDNA fetal
- * A superabundância de fragmentos de cfDNA do cr.21 na trissomia 21, embora pequena, pode ser medida pela metodologia de sequenciação

Harmony Prenatal - Metodologia do Teste

DANSR™



(Digital ANalysis of Selected Regions)

- ensaio directo de isolamento de cfDNA e análise.
- Método que permite elevado volume de amostras

FORTE™

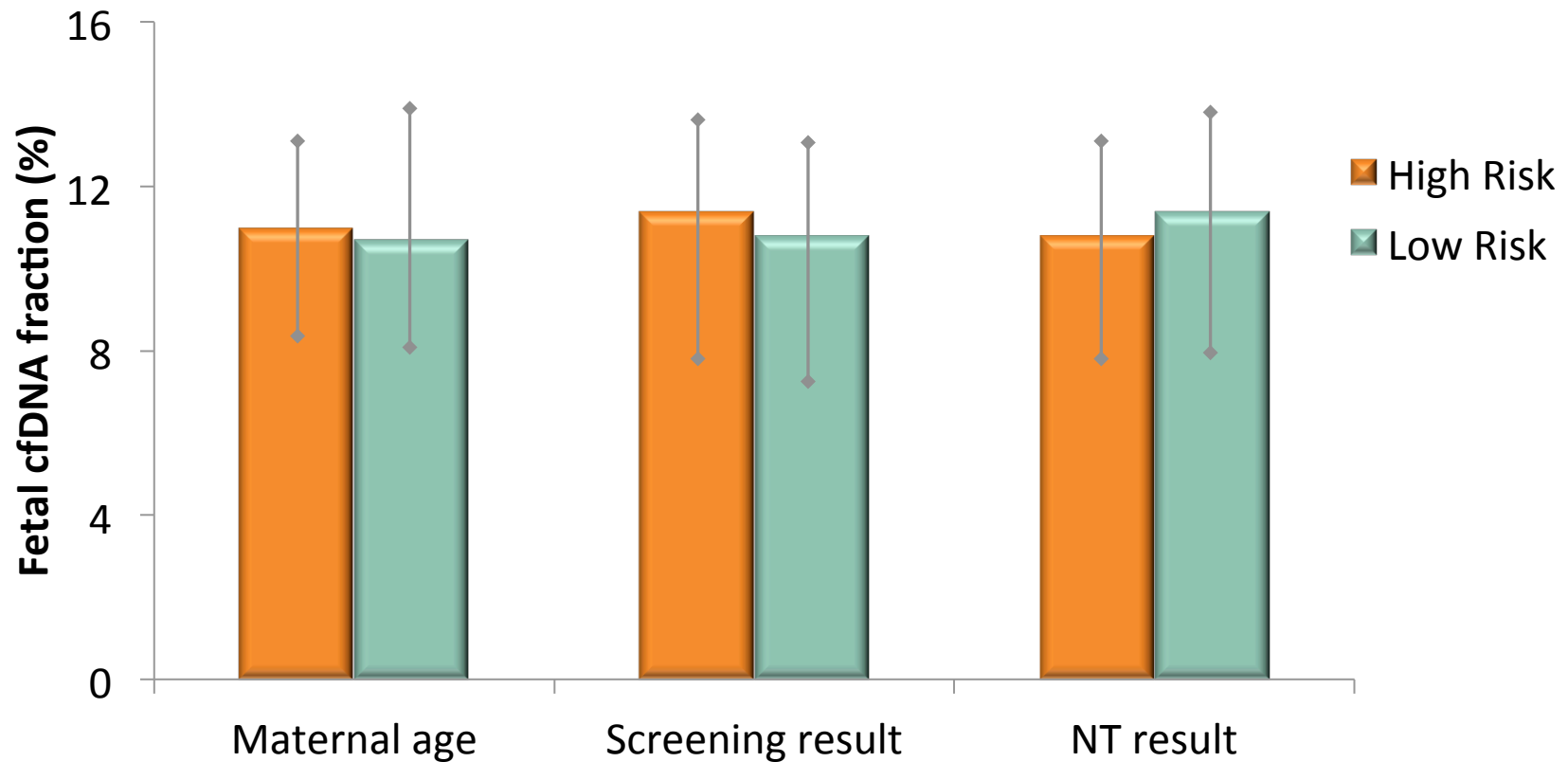


(Fetal-fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation)

- * software para obter o risco

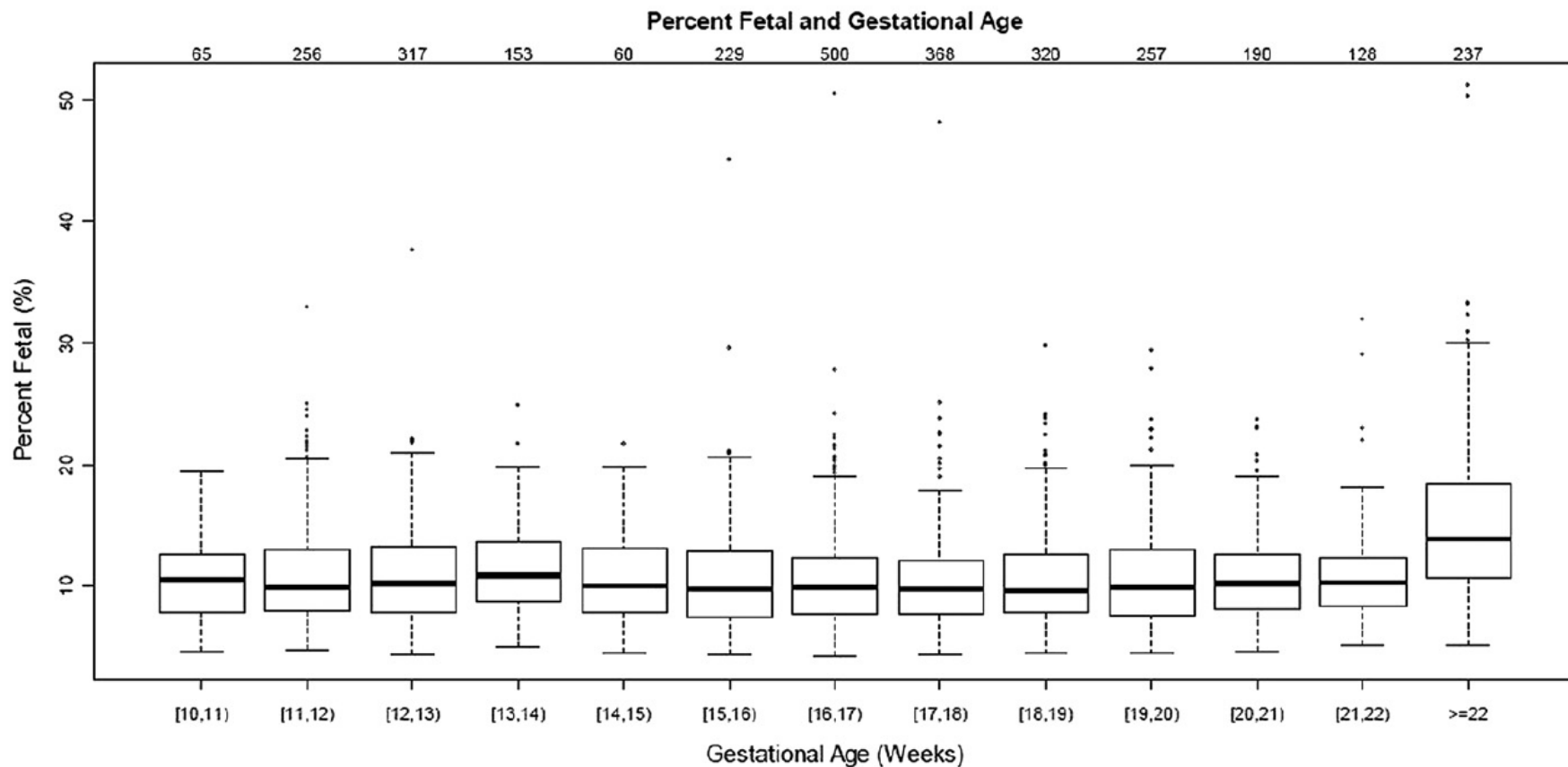
A metodologia permite um elevado volume e resultados clinicamente compreensíveis

A Fracção Fetal é constante nos diferentes grupos de risco



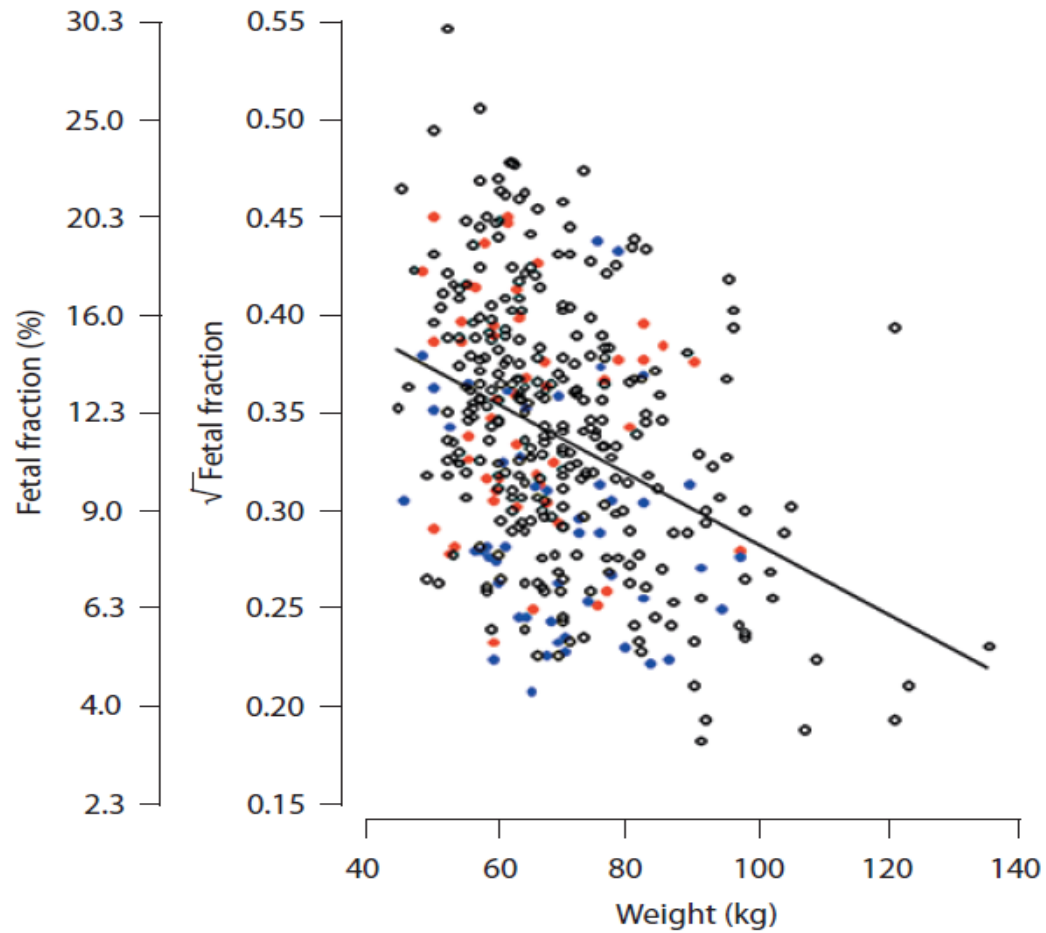
Permite afirmar que este teste é consistente nas gravidezes de risco elevado e de baixo risco

Fracção Fetal – Constante na IG



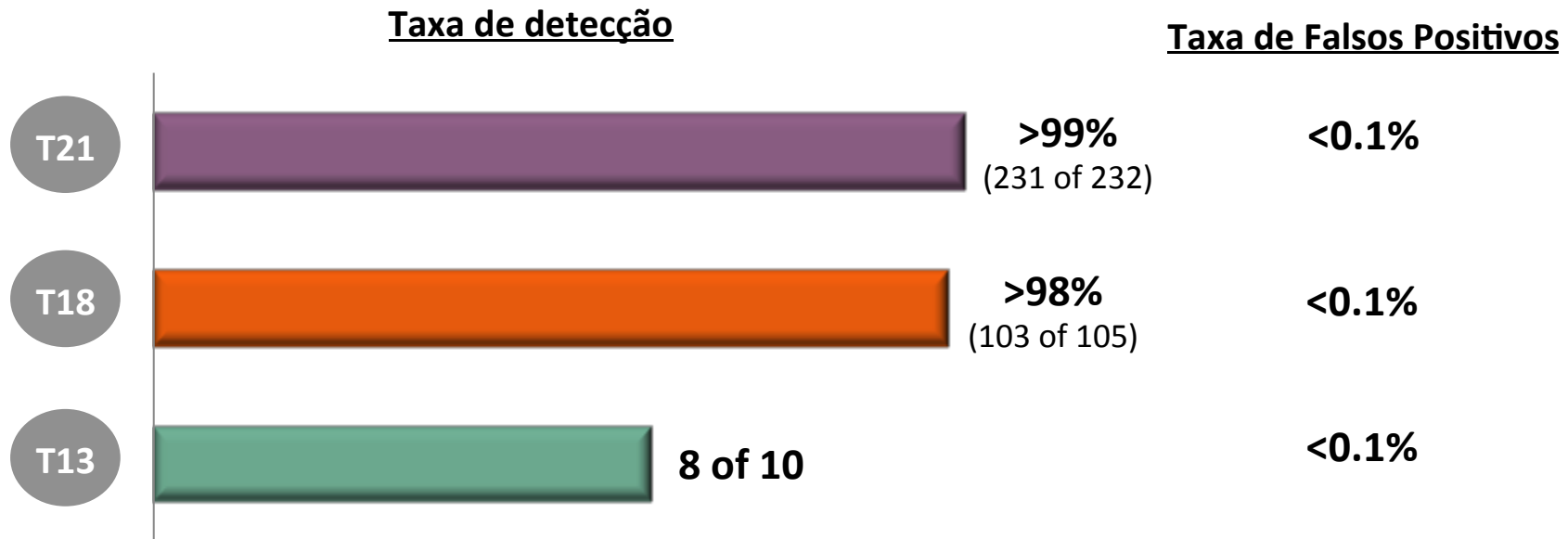
Norton, M., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: Results of a Multicenter, Prospective, Cohort Study for Detection of Fetal Trisomy 21 and Trisomy 18, *Am J Obstet Gynecol.* (2012), doi:10.1016/j.ajog.2012.05.021

O cffDNA – Diminui com o aumento do peso materno



Desempenho Clínico

>6,000 doentes, incluindo >2,000 grávidas com risco acrescido

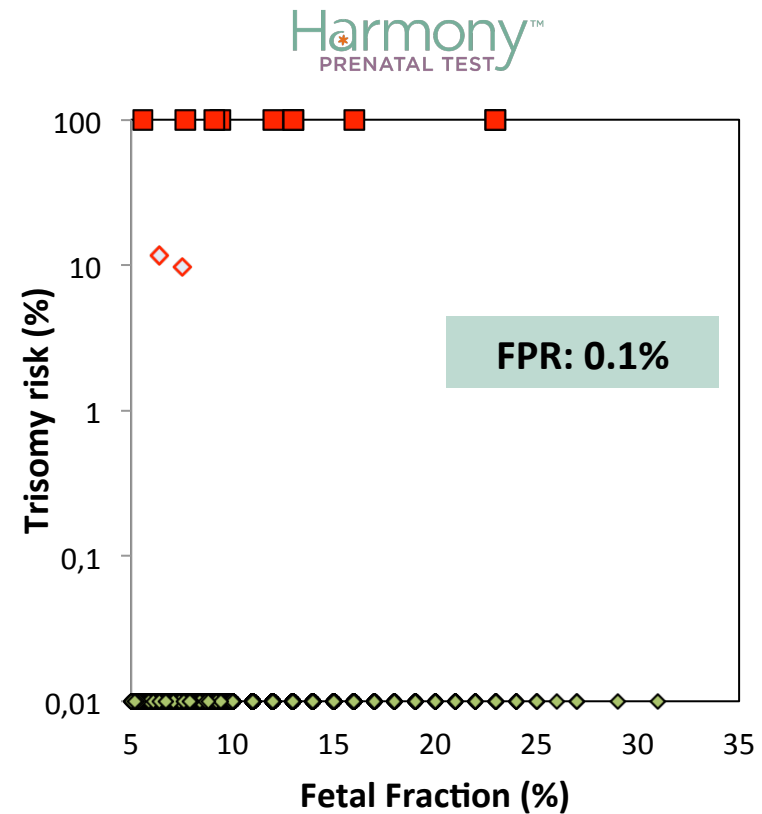
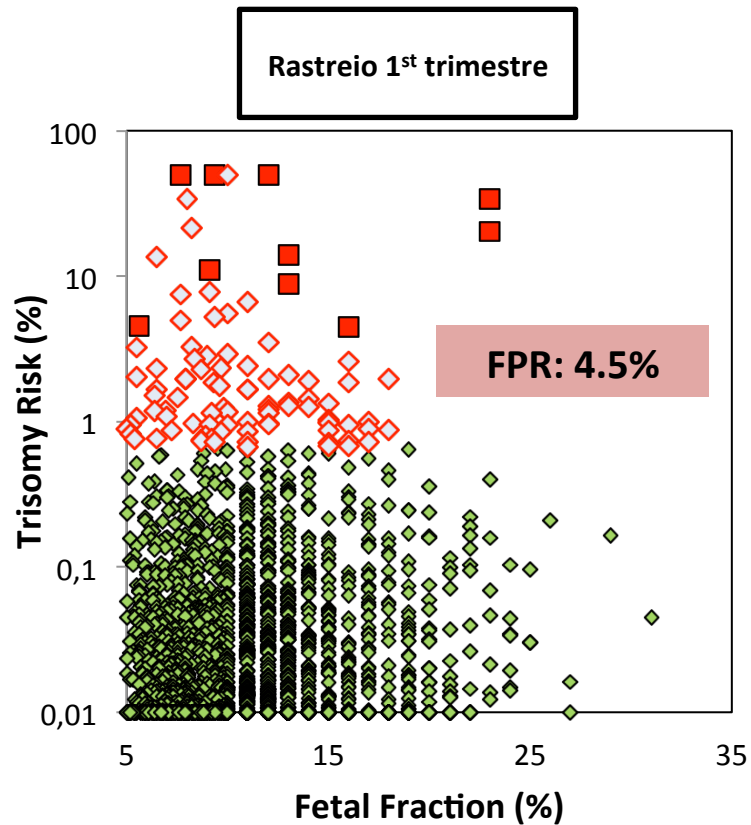
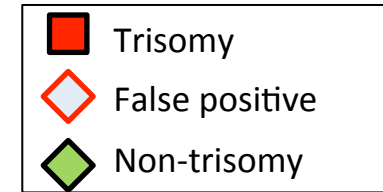


1. Sparks AB et al., Am J Obstet Gynecol. 2012 Apr;206(4):319.e1-9. 2. Ashoor G et al., Am J Obstet Gynecol. 2012 Apr;206(4):322.e1-5. 3. Sparks AB et al., Prenat Diagn. 2012 Jan;32(1):3-9. 4. Norton M et al., Am J Obstet Gynecol. 2012 Aug;207(2):137.e1-8. 5. Nicolaides KH et al., Am J Obstet Gynecol. 2012 Nov;207(5):374.e1-6. 6. Ashoor G et al., Ultrasound Obstet Gynecol. 2013 Jan;41(1):21-5. 7. Data on file

Resultados – Comparação do risco

Em ambas as figuras encontram-se o mesmo nº de grávidas

- 10 casos de trissomia
- 1,939 casos sem trissomia



Outras Possibilidades do teste

- **Harmony test com Y**
 - Avalia o cromossoma Y
 - Permite fornecer a informação sobre o sexo fetal*
- **Harmony test com XY**
 - Avalia o cromossoma X e o Y
 - Permite informação sobre sexo fetal e aneuploidias dos cromossomas sexuais

*Aneuploidia do Y é também avaliada e reportada, se existir

Relatório do Teste



Ariosa Diagnostics, Inc.
5945 Optical Court
San Jose, CA 95138

For Questions:
clientservices@ariosadx.com

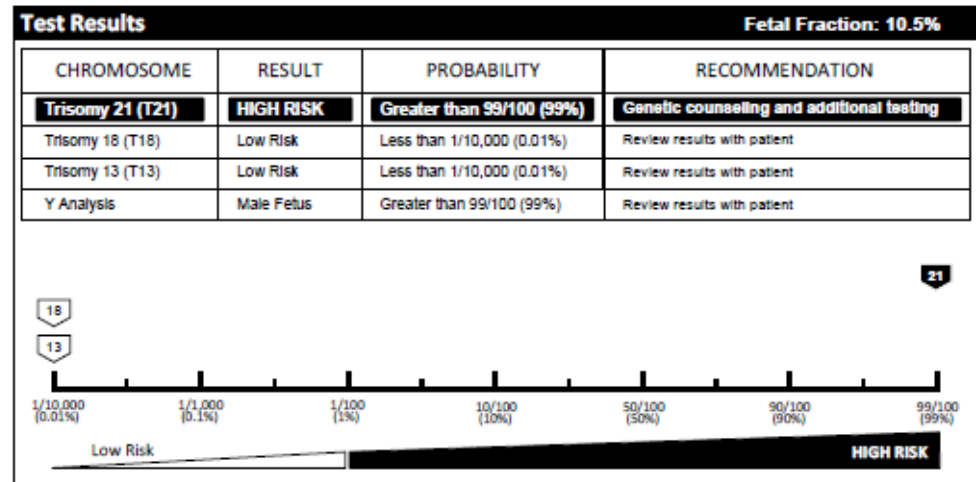
US: (855) 927-4672

Int: +1 (925) 854-6246

Patient and Provider Information	
PATIENT NAME:	Jane Doe
DATE OF BIRTH:	01/01/1970
MRN:	1234567890123456789
ARIOSA ID:	AD12345678-PAT
OTHER ID:	00123456789012345XZY
GESTATIONAL AGE:	10 wks 5 days
# OF FETUSES:	1
IVF STATUS:	non-IVF pregnancy
COLLECTION DATE:	01/01/2012
RECEIVED DATE:	01/02/2012
ACCOUNT #:	7854321
CLINIC NAME:	The Clinic Offering Test
REFERRING/ORDERING CLINICIAN:	Ordering Physician MD
REFERRING/ORDERING CLINICIAN FAX #:	123-456-7890
OTHER CLINICIAN:	Genetic Counselor MA, CGC
OTHER CLINICIAN FAX #:	987-654-3210
REPORT DATE:	01/10/2012

- Resultados distintos e individualizados

- Resultados de "risco elevado" são bem identificados



TEST DESCRIPTION

Ariosa's laboratory developed tests perform a directed analysis of cell-free DNA (cfDNA) in maternal blood and have been validated in pregnancies of at least 10 weeks gestational age. The probability of autosomal or sex chromosome aneuploidy is based on cfDNA in blood which may not always correlate with fetal genotype. Aneuploidy test results incorporate maternal age (or egg donor age) and gestational age-related risk based on information from the test requisition form. Tests are neither intended nor validated for diagnosis or use in mosaicism, partial chromosomal aneuploidy, translocations, or maternal aneuploidy. Not all aneuploid fetuses will be detected and some euploid fetuses may have high probability for aneuploidy results. Results should be considered with other clinical criteria and communicated in a setting that includes appropriate counseling.

The Harmony Prenatal Test measures the relative proportion of chromosomes to aid in the risk determination of fetal trisomies 21, 18, and 13. This test has only been validated in singleton pregnancies and in twin pregnancies (excluding twins from unrelated egg donors).

Y Analysis provides no information on the X chromosome. A "Female Fetus" result indicates a lack of significant Y chromosome sequences and does not exclude XO. A "Male Fetus" result does not exclude XOY. A Y "Aneuploidy" result indicates two or more fetal Y chromosomes. This test has only been validated in singleton pregnancies. Y "Aneuploidy" is reported only when probability is >99%.

CLINICAL DATA

	Detection Rate	False Positive Rate
T21	>99% (95% CI: 99.92%)	<0.1% (95% CI: 0.02%)
T18	>98% (95% CI: 98.92%)	<0.1% (95% CI: 0.02%)
T13	>98% (95% CI: 98.92%)	<0.1% (95% CI: 0.02%)

- Given rarity of condition, limited T13 cases analyzed
- Detection rate: 8 of 10 with Harmony
- False positive rate: <0.1% (95% CI: 0.0-0.3%)

Detection and false positive rates based on risk cut-off of 1/100 (1%) and are based on singleton, non egg donor pregnancies.

Y Analysis >99% accuracy for male or female sex (95% CI: 95-100%)
Y Analysis also provides probability for non-mosaic Y aneuploidy.

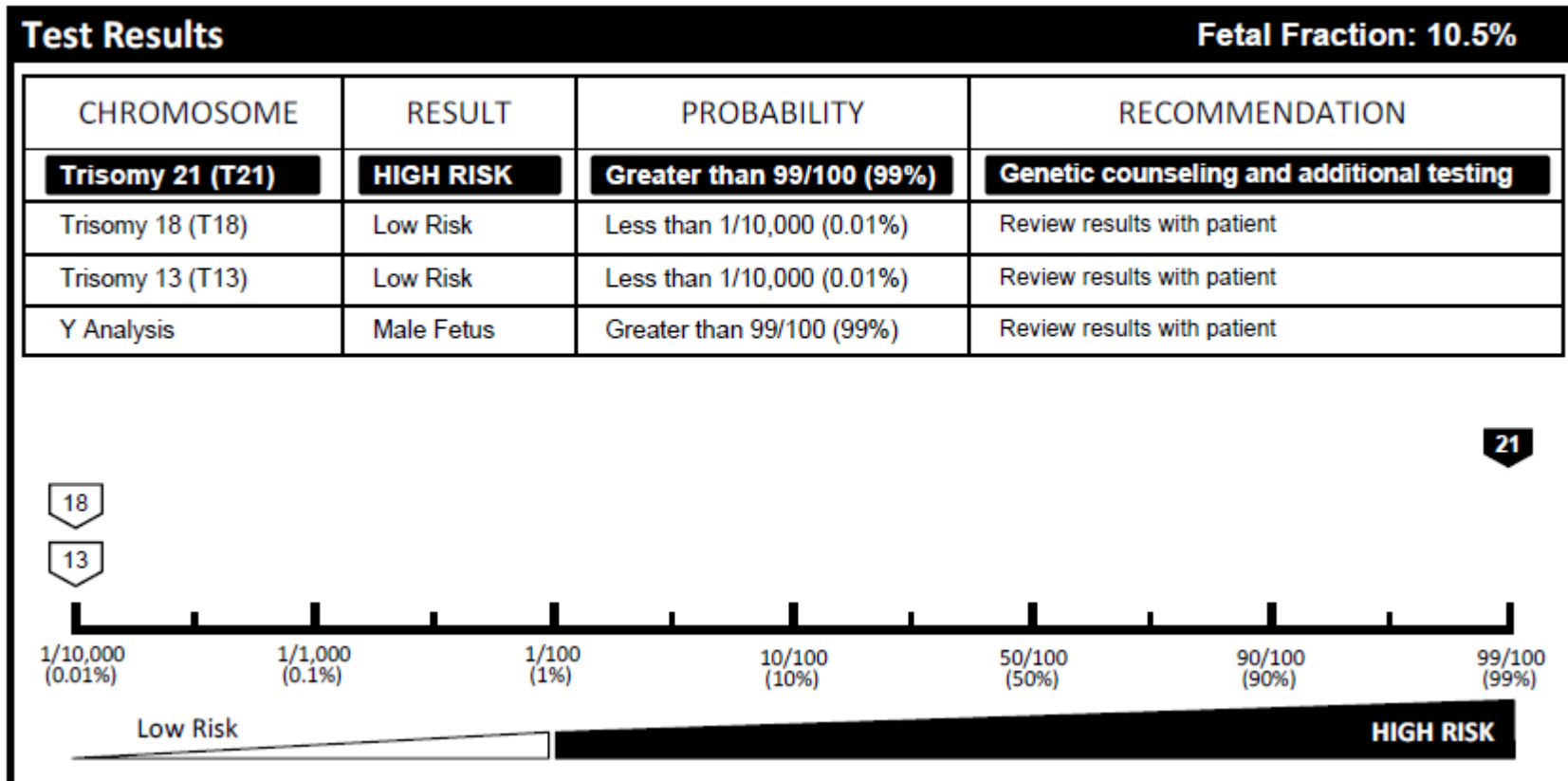
REFERENCES: Norton MF et al. (2012) Am J Obstet Gyn 207(2):137.e1-8, Nicolides KJ et al. (2012) Am J Obstet Gyn 207(5):376.e1-6, Ashoor G et al. (2012) Ultrasound Obstet Gynecol [epub ahead of print]. doi:10.1111/j.1469-0722.2012.01611.x

The Harmony Prenatal Test is intended for clinical use and should not be regarded as investigational or for research. It was developed, and its performance characteristics determined, by the Ariosa Diagnostics Clinical Laboratory, which is certified under the Clinical Laboratory Improvement Act of 1988 (CLIA) as qualified to perform high complexity clinical testing. The test has not been cleared or approved by the U.S. Food and Drug Administration.

Laboratory Director: M. Junaid Shabbeer, PhD, FACMG

CLIA #05D2032812 STATE # CLF 341864
TP-00115-F1 Rev 8.0

Resultados Individualizados





OBRIGADO