NATIVA

Il test per l'analisi del DNA fetale di ultima generazione

CE IVD

BIOREP

NATIVA

IL TEST PER L'ANALISI DEL DNA FETALE DI ULTIMA GENERAZIONE

NATIVA è il test prenatale non invasivo (NIPT - Non Invasive Prenatal Test) di ultima generazione. È un **test di screening** che fornisce una risposta **sulla possibile presenza di anomalie cromosomiche del feto** come la Sindrome di Down e le altre più comuni.

È rapido e privo di rischi per la mamma e il bambino perché non è invasivo. Analizzando i frammenti di DNA del feto, provenienti dai trofoblasti placentari che circolano liberamente nel sangue materno, è possibile individuare quali siano i soggetti a rischio per i quali è consigliabile un ulteriore approfondimento con tecniche diagnostiche invasive, come l'amniocentesi o la villocentesi.

NATIVA è effettuato nei laboratori di BioRep nella sede di Milano che si trova all'interno del Parco Scientifico San Raffaele, una delle strutture di riferimento per la Ricerca e la Diagnosi Clinica in Italia e in Europa.

NATIVA È CERTIFICATO CE-IVD (*In Vitro* Diagnostics) PER LE TRISOMIE 21, 18 E 13 E LE ANEUPLOIDIE DEI CROMOSOMI SESSUALI.

NATIVA:
IL NIPT DI ULTIMA GENERAZIONE

COSA ANALIZZA

NATIVA è il test di screening prenatale capace di rilevare **le trisomie 21, 18 e 13, le aneuploidie dei cromosomi sessuali e il sesso del nascituro**.

Alcune malattie genetiche sono ereditarie, altre, come la Sindrome di Down non lo sono, e possono insorgere in ogni gravidanza. La probabilità dell'insorgenza di anomalie cromosomiche cresce con l'aumentare dell'età della gestante e aumenta drasticamente dopo i 35 anni.

NATIVA accerta l'eventuale rischio di trisomie - condizioni che si verificano quando un individuo presenta un cromosoma in più rispetto all'usuale coppia di cromosomi - come nel caso della Sindrome di Down, della Sindrome di Edwards e della Sindrome di Patau.

- **Sindrome di Down (o trisomia 21):** è la trisomia più frequente alla nascita ed è causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 21. È associata a disabilità mentali gravi o moderate. Può inoltre causare problematiche che interessano l'apparato digerente e cardiaco.
- **Sindrome di Edwards (o trisomia 18)**: è causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 18 ed è associata a gravi malformazioni con un elevato rischio di aborto spontaneo e un'aspettativa di vita ridotta.
- **Sindrome di Patau (o trisomia 13)**: è causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 13 ed è associata ad un elevato rischio di aborto. I bambini nati con Sindrome di Patau solitamente presentano gravi difetti cardiaci congeniti ed altre patologie e difficilmente sopravvivono oltre il primo anno di vita.

Frequenza delle principali trisomie in rapporto all'età materna

Età Materna	Frequenza Sindrome di Down	Frequenza Sindrome di Edwards	Frequenza Sindrome di Patau
15 - 19	1:1.400	1:17.000	1:33.000
20 - 24	1:1.250	1:14.000	1:25.000
25 - 29	1:1.100	1:11.000	1:20.000
30 - 34	1:700	1:7.100	1:14.000
35 - 39	1:200	1:2.400	1:4.800
40 - 44	1:60	1:700	1:1.600

EB. (1981) Rates of chromosomal abnormalities at different maternal ages, Obstetrics & Gynecology, 58(3):282-5

Per quanto riguarda le aneuploidie sessuali, 1/400 uomini e 1/650 donne presentano aneuploidie dei cromosomi sessuali. Le conseguenze di questa tipologie di anomalie sono generalmente meno severe rispetto alle trisomie precedentemente elencate.

- **Sindrome di Turner (45,X0):** dovuta alla presenza di un solo cromosoma X nelle donne, con un frequenza di circa 1/2000 a 1/3000. I soggetti affetti presentano un fenotipo femminile, ma nell'85-90% dei casi, a causa di un insufficienza ovarica precoce, non sviluppano o sviluppano solo parzialmente i caratteri sessuali secondari con infertilità oppure vanno incontro a menopausa precoce. Inoltre possono essere presenti difetti cardiaci, anomalie renali e bassa statura. L'intelligenza è solitamente normale ma possono essere presenti disturbi dell'apprendimento, ritardo psicomotorio e disturbo del comportamento.
- **Sindrome di Klinefelter (47,XXY):** La sindrome di Klinefelter è una condizione caratterizzata dalla presenza di un cromosoma sessuale X in più nei soggetti di sesso maschile. I soggetti affetti presentano una riduzione dei valori di testosterone, se non trattati precocemente alla pubertà, possono presentare ipogonadismo ed infertilità. E' presente un rischio aumentato di ritardo del linguaggio e disturbo dell'apprendimento.
- **Trisomia del cromosoma X (47,XXX):** dovuto alla presenza di un cromosoma X extra nelle femmine. Si tratta della più comune anomalia cromosomica femminile, che si verifica approssimativamente in 1 su 1.000 nascite femminili. Non comporta caratteristiche fenotipiche peculiari. Viene riportata spesso un alta statura proporzionata. Lo sviluppo puberale è normale, ma in un terzo dei casi può essere presente ridotta fertilità, dismenorrea e menopausa precoce. In due terzi dei casi può essere presente un ritardo dello sviluppo psicomotorio.
- **Sindrome di Jacobs o disomia dell'Y(47, XYY):** La sindrome del doppio Y ha un incidenza di circa 1/1000 nati maschi. La maggior parte degli uomini affetti presenta alta statura con normale sviluppo sessuale e fertilità solitamente conservata. Lo sviluppo intellettivo è solitamente nella norma, può essere presente ritardo deli linguaggio, disturbo dell'apprendimento e ipotonia muscolare. Segnalata alta statura.

Caratteristiche	Klinefelter	XYY o Jacobs	Turner	Tripla X
Cariotipo	47,XXY	47,XYY	45,X0	47,XXX
Sesso fenotipico	Maschio	Maschio	Femmina	Femmina
Gonadi	Ipogonadismo da riduzione testosterone	Normale	Insufficienza ovarica	Normale
Fertilità	Infertilità	Solitamente normale	Infertilità	Solitamente normale
Intelligenza	Normale	Normale	Solitamente Normale	Normale
Problemi del comportamento	Sporadici	Sporadici	Sporadici	Sporadici
Altre caratteristiche	Disturbo del linguaggio, disturbo dell'apprendimento	Disturbo del linguaggio, disturbo dell'apprendimento	Bassa statura, disturbo del linguaggio, disturbo dell'apprendimento, possibili altre anomalie a carico di cuore, scheletro, reni	Disturbo del linguaggio, disturbo dell'apprendimento

Da Harper PS: Pratical genetic Counseling, 6th ed. London, Arnolf Publisher, 2004, p.69.

A CHI PRESCRIVERE IL TEST

NATIVA è ideale per tutte le donne in attesa in quanto permette di evitare i rischi legati a esami diagnostici invasivi. Può essere effettuato dalla 10a settimana di gravidanza in poi.

NATIVA può essere eseguito anche in caso di:

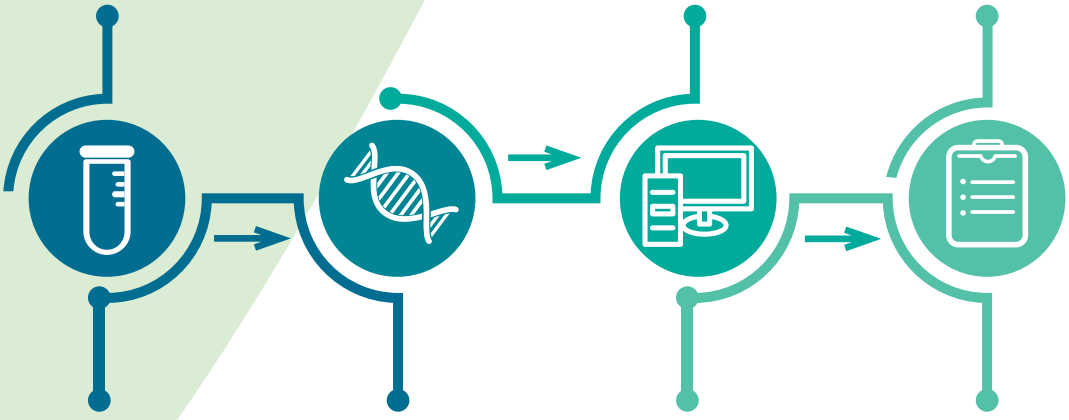
- **gravidanze gemellari;**
- **gravidanze concepite per ovodonazione;**
- **gravidanze surrogate.**

Ci sono condizioni per le quali il test di screening del DNA fetale è particolarmente indicato:

- **L'età della mamma superiore ai 35 anni;**
- **L'esito POSITIVO dello screening del primo o del secondo trimestre (Bi/Tri Test);**
- **La gravidanza a rischio di aborto spontaneo;**
- **Le anomalie del bambino evidenziate dall'ecografia;**
- **La storia familiare risulti a rischio di anomalie cromosomiche.**

COME EFFETTUARE IL TEST

NATIVA analizza i frammenti di DNA del bambino rilasciato dai trofoblasti placentali e che circolano liberamente nel sangue materno. Il procedimento è semplice e il risultato si ottiene in soli 5/7 giorni lavorativi a partire dal ricevimento del campione di sangue in laboratorio.
Il test consiste in un semplice prelievo di sangue della mamma. È privo di effetti collaterali, non è invasivo e non comporta alcun rischio per la mamma e il bambino. Il campione di sangue viene ritirato dal corriere espresso e consegnato presso i laboratori di BioRep.



BioRep offre assistenza anche dopo il referto: oltre a un consulto con il nostro genetista, in caso di positività, sarà possibile effettuare l'amniocentesi o la villocentesi gratuitamente presso i centri convenzionati.

NATIVA: LA RISPOSTA PIÙ ATTENDIBILE E ACCURATA

NATIVA è il test prenatale non invasivo validato su oltre 3.000 gestanti, fornisce informazioni precise e puntuali sulle trisomie 21, 18 e 13 e sulle aneuploidie sessuali, inoltre è in grado di determinare il sesso del feto con elevata attendibilità.

NATIVA, grazie alla maggiore sensibilità e specificità rispetto al test combinato, può diminuire il ricorso a esami diagnostici invasivi, riducendo il rischio di aborto ad essi correlato.

I valori di Specificità e Sensibilità di **NATIVA** sono elevatissimi, e rendono il test estremamente affidabile.

SENSIBILITÀ
> 99,9%
IDENTIFICA LA PRESENZA DI ANOMALIE
↓
RIDOTTE POSSIBILITÀ DI FALSI NEGATIVI

SPECIFICITÀ
> 99,9%
ESCLUDE LA PRESENZA DI ANOMALIE
↓
RIDOTTE POSSIBILITÀ DI FALSI NEGATIVI

TECNOLOGIA ALL'AVANGUARDIA: NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)

NATIVA è basato sulla tecnologia VeriSeq di Illumina, l'unica soluzione automatizzata ed interamente conforme alle direttive CE-IVD per lo screening delle trisomie fetali più comuni (trisomie 21, 18 e 13) e le aneuploidie dei cromosomi sessuali. Il DNA di ogni essere vivente è composto dalla ripetizione di sole **quattro molecole chiamate basi azotate: Adenina, Timina, Guanina e Citosina**. La tecnologia di NGS permette di conoscere la sequenza del DNA umano, attraverso la lettura ordinata di ogni singola base che compone i filamenti di DNA, e di effettuare la conta dei cromosomi a partire dal campione di sangue materno.

IL PROCESSO DI SEQUENZIAMENTO

Preparazione del campione

- **Il campione di sangue materno viene raccolto in speciali tubi CE-IVD**, inviato nei laboratori di BioRep e registrato all'interno del database, che garantisce la tracciabilità e azzera i rischi nella gestione del campione.
- **Il sangue viene centrifugato per separare il plasma, dal quale sarà poi estratto il DNA circolante** sia materno sia fetale (ccfDNA, circulating cell free DNA).

Dall'estrazione del DNA alla sequenza nucleotidica

- **Il DNA circolante viene isolato attraverso un sistema automatizzato** basato su estrazione per affinità su polimeri. Questa tecnologia consente di processare fino a 96 campioni contemporaneamente senza rischi di errori perché il processo è interamente automatizzato.
- **I 96 campioni vengono identificati con uno speciale codice a barre molecolare** che permetterà l'identificazione di ogni frammento di DNA proveniente da ciascun campione. **I campioni vengono preparati per il sequenziamento (library) e raggruppati in un unico "pool"**.
- **Il pool di DNA viene caricato all'interno del sequenziatore** che effettua le operazioni di sequenziamento e controllo qualità del processo.
- **Il sequenziatore immobilizza i filamenti di DNA del pool su uno speciale supporto chiamato "flow cell" o cella di flusso. Ogni frammento viene amplificato fino alla creazione di un "cluster"**, un gruppo di centinaia di milioni copie identiche delle stesso frammento.

- Nella flow cell vengono iniettate in sequenza delle soluzioni contenti le quattro basi che formano i filamenti di DNA (A,G,C,T). **Ogni volta che una delle basi viene accoppiata a uno dei filamenti presenti sulla flow cell viene registrata un'emissione luminosa di colore diverso a seconda della base incorporata**. Il sequenziatore riconosce le emissioni luminose di miliardi di frammenti contemporaneamente e annota la sequenza.

Dalla sequenza nucleotidica al referto

- Una volta ottenuta la sequenza di ogni frammento, i dati vengono elaborati da uno speciale **software certificato CE-IVD** in grado di discriminare il DNA fetale da quello materno e di contare la numerosità dei cromosomi fetali.
- Tutti i cromosomi vengono sequenziati (Whole Genome Sequencing) ma **vengono analizzate le anomalie solo ed esclusivamente dei cromosomi 21, 18 e 13, X e Y (se presente)**.
- **Il nuovo algoritmo di Illumina permette di analizzare anche i campioni con percentuale di frazione fetale inferiore al 4%** utilizzando un'analisi a soglia variabile che modifica la sensibilità del sistema in base alla quantità di DNA fetale rilevato. Inoltre, **NATIVA** utilizza la numerosità dei frammenti di DNA fetale sequenziati come parametro per l'affidabilità del test, rendendo obsoleto il limite del 4% relativo alla frazione fetale.
- Il limite del 4% è stato storicamente fissato a causa delle tecnologie utilizzate in precedenza (Array) che rendevano non affidabili i risultati dei test quando la frazione fetale era sotto quella soglia.
- **Il risultato dell'analisi viene controllato dal genetista** che è a disposizione per il consulto dei referti.

TECNOLOGIE DI SCREENING PRENATALE A CONFRONTO

NATIVA, grazie all'utilizzo di metodiche e algoritmi innovativi, è l'unico test basato su tecnologia NGS certificato CE-IVD per ogni fase del processo di analisi. Sequenziando l'intero genoma del bambino NATIVA è in grado di fornire risultati attendibili anche in caso di frazione fetale inferiore al 4%.

Tipo di test	Metodologia di analisi	Calcolo frazione fetale	Soglia limite frazione fetale	Tasso di fallimento
NATIVA	Whole Genome Sequencing	Paired End Sequencing	<4%	0,68%*
Test basato su tecnologia array	Ibridazione su chip array	SNP	4%	3,00%**
Test basato su sequenziamento limitato ai soli cromosomi 13, 21, 18,X,Y	Target Sequencing	SNP	4-8%	6,40%***

* Illumina VeriSeq NIPT Solution Package Insert
** MCCullogh RM et al. PLoS ONE 2014
*** Dar et al. Am J Obstet Gynecol 2014

PAIRED END SEQUENCING

Nel sangue materno è presente il DNA libero circolante sia del bambino che della mamma. E' necessario quindi disporre di un sistema di rilevazione accurato, e che selezioni senza possibilità di dubbio il DNA libero circolante del bambino su cui effettuare l'analisi delle aneuploidie. La metodologia di sequenziamento denominate Paired-End Sequencing (PE), sequenzia ogni frammento di DNA da entrambe le estremità, invece che da un solo lato. In questo modo è possibile conoscere, oltre alla sequenza, la dimensione esatta di ogni frammento analizzato. E' stato dimostrato che in un campione di sangue materno i frammenti di dimensioni minori sono associati ad origine fetale mentre i frammenti più lunghi tendono ad essere di origine materna. L'introduzione della metodologia Paired-End sequencing è in grado di aumentare l'informazione generata da ogni sequenziamento ed effettuare quindi un'analisi più accurata, diminuendo di un terzo la profondità di sequenziamento richiesta rispetto ad altri test.

1 Lo YN, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med. 2010;61(2):61-91.

QUALITÀ CERTIFICATA

Tutto il flusso di analisi di NATIVA è certificato CE-IVD (*In-Vitro* Diagnostic) ed è eseguito nelle **strutture abilitate SMeL (Servizio di medicina di Laboratorio)** di Biorep, nella sede di Milano all'interno del Parco Scientifico San Raffaele.
La certificazione CE-IVD, rilasciata della Comunità Europea, attesta che **NATIVA soddisfa i requisiti essenziali e i livelli di performance previsti per i prodotti ad uso medicale**. La certificazione viene rilasciata solo se il prodotto è conforme alla **Direttiva 98/79/CE** ed è garanzia di qualità e sicurezza.

UN REFERTO CHIARO, IN TEMPI BREVI

Il referto di NATIVA riporta la percentuale di frazione fetale analizzata e la presenza o assenza di anomalie. In caso di positività è necessario sottoporsi a diagnosi invasiva.

Il referto viene consegnato entro 5/7 giorni lavorativi dal ricevimento del campione e, in caso di positività, è possibile rivolgersi al nostro genetista per una consulenza.

LE PROCEDURE DI SCREENING PRENATALE A CONFRONTO

I test non invasivi standard del primo trimestre, come il bi-test, non individuano più dell' %* dei casi di trisomia 21.

Test su screening	Materiale biologico analizzato	Condizioni analizzate	Tasso di rilevamento della trisomia 21
Screening combinato del primo trimestre	Analisi del sangue per PPAPP-A e hCG, più un'ecografia ad ultrasuoni	Trisomia 21 Trisomia 13 Trisomia 18	82%-87%*
NATIVA	Analisi del sangue per DNA fetale libero circolante	Trisomia 21 Trisomia 13 Trisomia 18 X0, XXX, XXY. XYY	99,9%

*Screening Tests for Birth Defects, American Congress of Obstetricians and Gynecologists, 2017.

NATIVA è un test di screening che si propone come **alternativa ai test non invasivi standard**. È in grado di fornire risposte anche se la frazione fetale è al di sotto del 4%, diminuendo il numero di esami invasivi non necessari e riducendo il rischio di aborto ad essi correlati.

AVVERTENZE

NATIVA è certificato CE-IVD per l'analisi delle trisomie 21, 18 e 13, delle aneuploidie dei cromosomi sessuali e del sesso fetale, come consigliato dalle Linee Guida Ministeriali. In caso di necessità sarà premura del medico curante utilizzare le informazioni ottenute dal test per indirizzare la paziente verso un'ulteriore consulenza genetica o sottoporla a ulteriori accertamenti tramite villocentesi o amniocentesi. La specificità e la sensibilità dichiarate non escludono la presenza di falsi positivi o falsi negativi a causa di modifiche cromosomiche della placenta (mosaicismo confinato alla placenta) oppure della madre o del feto (mosaicismo cromosomico).

NATIVA NATIVA non esclude altre anomalie e malformazioni del feto, in quanto analizza esclusivamente la presenza delle trisomie 21, 18 e 13 e le aneuploidie dei cromosomi sessuali.

In caso di gravidanze gemellari **NATIVA**:
- è in grado di rilevare le trisomie 21, 18 e 13 ma non è in grado di indicare quale feto ne è affetto;
- non può rilevare le aneuploidie dei cromosomi sessuali;
- può individuare la presenza di almeno un feto di sesso maschile o indicare se entrambi sono di-sesso femminile.

NATIVA non è raccomandato in caso di:
- **Vanishing twin**
- **Gravidanze multiple con più di due feti**
- **Gestante nota per essere affetta da tumore**
- **Immunoterapia, radioterapia o emotrasfusione eseguita dalla gestante entro i 3 mesi precedenti**
- **Trapianto allogenico d'organo nella gestante**
- **Mosaicismi cromosomici presenti nella madre coinvolgenti i cromosomi oggetto d'indagine**

PERCHÈ SCEGLIERE NATIVA

NATIVA è il test di screening prenatale testato su oltre 3.000 gestanti in grado di rilevare le trisomie 21, 18 e 13, le aneuploidie sessuali e il sesso del feto e di fornire un risultato attendibile anche in caso di frazione fetale inferiore al 4%.

RAPIDO

Il referto è elaborato e pronto in 5/7 giorni lavorativi dal ricevimento del campione nei laboratori.

ESEGUITO IN ITALIA

NATIVA è interamente eseguito nei laboratori di BioRep nella sede di Milano, situati all'interno del Parco Scientifico San Raffaele.

CONFORME

NATIVA rispetta quanto previsto dalle Linee Guida del Ministero della Salute per lo screening prenatale non invasivo basato sul DNA (03/07/2015).

CERTIFICATO

NATIVA utilizza dispositivi di raccolta, processi di laboratorio e analisi certificati CE-IVD.

ACCURATO

NATIVA si avvale di una piattaforma di NGS che garantisce la migliore performance in termini di specificità e sensibilità, con il più basso tasso di falsi positivi e falsi negativi.

CONSULENZA GENETICA

Il nostro **Customer Care** e il T**eam di Consulenza Genetica** sono a disposizione per un consulto medico prima e dopo la consegna del referto.

BioRep è una società del Gruppo Sapio che opera nel campo delle biotecnologie a livello internazionale. Nata nel 2003, BioRep è un **Centro di Risorse Biologiche** in grado di fornire soluzioni complete per la conservazione a lungo termine di materiale biologico e servizi di laboratorio a istituti di ricerca pubblici e privati (ospedali, università, cliniche), aziende biotech e farmaceutiche, garantendo i più elevati livelli di qualità e sicurezza.

Grazie alle più avanzate tecnologie di sequenziamento con tecniche di **Next-Generation Sequencing (NGS)**, BioRep offre anche servizi di analisi del **DNA** a fini diagnostici o di ricerca. BioRep è certificata UNI EN ISO 9001 ed è dotata di una infrastruttura tecnologica tra le più avanzate a livello internazionale.

01/18_rev.03

www.biorep.it

BIOREP | SAPIO GRUPPO Respirare il futuro

BIOREP S.R.L.

Via Olgettina, 60 - c/o DIBIT 2 - Palazzina San Michele 1 - 20132 Milano
Tel. +39 02 58014369 - Fax +39 02 58018471 - E-mail nipt@biorep.it