PERCORSO CLINICO PER LA DIAGNOSI GENETICA DELLA CARDIOMIOPATIA IN UN SISTEMA ASSISTENZIALE IN RETE ANMCO Toscana

Linee d'indirizzo della Regione Toscana

Allegato A

Decisione Comitato Tecnico Scientifico n. 16 del 22/07/2020

Regione Toscana

Articolazione funzionale dell‘Organismo Toscano per il Governo Clinico, ai sensi dell‘art. 49 ter della l.r. 40/2005:

a) Coordinatore;
b) Ufficio di coordinamento;
c) Comitato tecnico scientifico

Coordinatore dell‘OTGC
Dr. Mario Cecchi

Segretario dell‘OTGC
Dr.ssa Maria Teresa Mechi

Supporto amministrativo:
Stefania Della Luna
Giuseppina Agata Stella

Il presente documento è stato prodotto da un gruppo multidisciplinare di esperti su mandato dell’Organismo Toscano per il Governo Clinico (istituito con Legge regionale 24 febbraio 2005 n. 40, modificata con Legge regionale 25 luglio 2017 n. 36).
L’intero documento in formato PDF è consultabile sul sito Internet della Regione Toscana al seguente indirizzo: http://www.regione.toscana.it/pubblicazioni
Chiunque è autorizzato, per fini informativi, di studio o didattici, a utilizzare e duplicare i contenuti di questa pubblicazione, purché ne citi la fonte utilizzando la seguente dicitura: Tratto da (*TITOLO DEL DOCUMENTO*), Organismo Toscano per il Governo Clinico, Settore qualità dei servizi e reti cliniche, Direzione Diritti di Cittadinanza e Coesione sociale, Regione Toscana.

Organismo Toscano per il Governo Clinico
Via T. Alderotti, 26/n
50139 Firenze (FI)
otgc@regione.toscana.it

Autori

Francesca Girolami, Giuseppe Vergaro, Maurizio Pieroni, Silvia Passantino, Giovanna Giannotti, Gabriele Grippo, Maria Laura Canale, Silvia Favilli, Francesco Cappelli, Iacopo Olivotto, Giancarlo Casolo.

Premessa

Le Cardiomiopatie Ereditarie, Cardiomiopatia Ipertrofica, Cardiomiopatia Dilatativa, Cardiomiopatia Aritmogena, Cardiomiopatia Restrittiva e Ventricolo sinistro non compatto, sono patologie clinicamente e geneticamente molto eterogenee, e rappresentano una causa frequente di arresto cardiaco e morte improvvisa. A causa delle ricadute sociali di queste patologie l'attenzione è focalizzata sulla possibilità di identificare precocemente le malattie o identificare i portatori dei geni che le causano creando così aspettative da soddisfare, difficoltà di indirizzo della domanda e delle indicazioni ai test genetici, e soprattutto del significato dei test e delle ricadute pratiche.
Il presente documento ha lo scopo di rappresentare uno strumento operativo di supporto ai Cardiologi Ospedalieri della Toscana per rendere più fruibile e appropriato l'utilizzo del test genetico per i propri pazienti con sospetta o accertata cardiomiopatia ereditaria ed offrire una linea di indirizzo scientificamente solida e concreta nel suo utilizzo pratico. Tutto ciò al fine di impedire anche il proliferare di test fuori controllo, fughe in altre regioni, aspettative fuori contesto. Il documento è in corso di stampa sul Giornale Italiano di Cardiologia (GIC 2020)

Il test genetico oggi viene effettuato mediante la tecnica *Next Generation Sequencing,* metodo che ha reso possibile l'analisi di centinaia di geni in molti pazienti contemporaneamente, abbreviando i costi ed i tempi di esecuzione. Tuttavia l'impiego delle nuove metodiche di sequenziamento ha fatto emergere nuove problematiche riguardanti le indicazioni all'accesso al test, l'interpretazione del dato e le implicazioni cliniche dei risultati.
Numerosi laboratori, pubblici e privati, hanno scelto di analizzare pannelli di geni diversi e molto estesi (oltre 100 geni), con lo scopo di identificare la variante causativa in un numero sempre più alto di pazienti. Tuttavia è stato osservato che, contrariamente all'atteso, il numero di pazienti caratterizzati è aumentato in modo limitato, con scarsa ricaduta sul piano clinico.

Nella realtà, a scopo diagnostico è indicato utilizzare un pannello ristretto di geni (geni *core*) **selezionati per avere la massima sensibilità, specificità e validità clinica in modo da ottimizzare il rapporto costo-utilità del test e limitare il numero di risultati inconcludenti**.

Il pannello di geni *core* può essere ampliato in casi eccezionali, come in presenza di una famiglia ampia con numerosi affetti (in modo da poter segregare l'eventuale variante sconosciuta in un numero significativo di pazienti) od in presenza di fenotipi misti e fenotipicamente indistinguibili sul piano clinico. È comunque sempre raccomandato informare il paziente e ottenere il consenso informato alla nuova analisi.

Diagnosi Genetica

Si raccomanda di richiedere il test genetico solo in caso di diagnosi certa di cardiomiopatia o in presenza di un fondato sospetto clinico. Le linee guida internazionali raccomandano che, ove possibile, la diagnosi sia formulata da cardiologi esperti di malattie genetiche cardiovascolari.

Il test genetico nei pazienti con CMPs offre le seguenti opportunità:

- **Evidenziare la causa genetica della CMP**
- Ricerca/esclusione di fenotipi rari (alcuni dei quali come la malattia di Fabry e l'amiloidosi da Transtirerina mutata, passibili di terapie specifiche)
- Studio familiare (test a cascata).
- Accesso alla consulenza genetica

Campo di applicazione

- Cardiomiopatia Ipertrofica
- Cardiomiopatia Dilatativa
- Cardiomiopatia Aritmogena
- Cardiomiopatia Restrittiva
- Ventricolo sinistro non compatto
- Malattia di Danon
- Glicogenosi da PRKAG2
- Malattia di Fabry
- Cardiomiopatia amiloidotica familiare

Accesso al test genetico

a) Per il Cardiologo che non lavora in una struttura di riferimento per le CMPs è consigliato inviare il paziente ad una struttura di Genetica Medica dove il genetista clinico esegue una visita di genetica medica e prescrive il test genetico.
b) Nel caso di un paziente con ipotesi diagnostica specifica già formulata dal cardiologo la consulenza genetica associata al test può essere eseguita dal biologo specialista in genetica medica. Questa modalità, possibile solo in alcune Regioni, come ad esempio la Toscana, viene eseguita soltanto in centri multi-specialistici dedicati dove il cardiologo ed il genetista lavorano a stretto contatto.
c) Il Cardiologo può inviare direttamente il prelievo con il consenso informato e la prescrizione del test genetico al laboratorio di riferimento. Tale modalità, possibile solo in alcune Regioni, è però scoraggiata perché non si avvale del valore aggiunto della consulenza genetica.

Conclusioni

Il test genetico per le CMPs gioca un ruolo cruciale nella diagnosi del probando e nella gestione dei familiari a rischio, ma il suo uso richiede la rigida applicazione di criteri di appropriatezza.

È bene sapere che :

- Talvolta, nei casi in cui il test genetico conferma la presenza di una patologia rara, l'analisi genetica permette di indirizzare la terapia.
- L'impatto sulla stratificazione del rischio e sulla prognosi è limitato.
- L'interpretazione del test, quindi la classificazione delle varianti, ha un ruolo determinante per la gestione clinica e richiede **una stretta collaborazione tra i vari specialisti in particolare il cardiologo, il genetista di laboratorio ed il genetista clinico che dovrebbero lavorare a diretto contatto in centri dedicati di Cardiogenetica**.
- Quanto maggiore sarà la precisione della diagnosi pre-test con cui i pazienti vengono inviati, tanto maggiore sarà l'accuratezza e la pregnanza clinica della risposta.

In Toscana vi sono almeno 3 laboratori che possono svolgere questa funzione, uno per Area Vasta.

(In allegato pubblicazione scientifica di riferimento)

Percorso clinico proposto dall'ANMCO Toscana per la diagnosi genetica delle cardiomiopatie in un sistema assistenziale in rete

Francesca Girolami[1], Giuseppe Vergaro[2], Maurizio Pieroni[3], Silvia Passantino[1], Giovanna Giannotti[4], Gabriele Grippo[4], Maria Laura Canale[4], Silvia Favilli[1], Francesco Cappelli[5], Iacopo Olivotto[5], Giancarlo Casolo[4], a nome della Sezione Regionale ANMCO Toscana

[1]*S.O.C. Cardiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Firenze*
[2]*Fondazione Toscana G. Monasterio, Pisa*
[3]*Dipartimento Cardiovascolare, Ospedale San Donato, Arezzo*
[4]*Dipartimento di Cardiologia, Ospedale Versilia, Lucca*
[5]*Unità Cardiomiopatie, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Università degli Studi, Firenze*

Hereditary cardiomyopathies, hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, arrhythmogenic cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy and left ventricular noncompaction, are clinically and genetically very heterogeneous diseases, and they represent a frequent cause of cardiac arrest and sudden death. To date, over 100 genes are known to be associated with the onset of cardiomyopathies. Genetic testing is performed by next generation sequencing, a technology that has made it possible to analyze hundreds of genes in many patients simultaneously, shortening costs and execution times. However, with the use of this technology, new problems have arisen regarding the indications for access to the test, the interpretation of the data and the clinical implications of the results.

This document aims to represent an operational support tool for hospital cardiologists to make the use of genetic testing more accessible and appropriate for their patients with suspected or ascertained hereditary cardiomyopathy.

Key words. Cardiomyopathy; Genetic analysis; Genetics; Next generation sequencing.

G Ital Cardiol 2020;21

RAZIONALE

Il presente documento ha lo scopo di rappresentare uno strumento operativo di supporto ai cardiologi ospedalieri per rendere più fruibile e appropriato l'accesso al test genetico per i propri pazienti con sospetta o accertata cardiomiopatia (CMP).

LE CARDIOMIOPATIE EREDITARIE

Premessa

Le CMP ereditarie sono patologie clinicamente e geneticamente molto eterogenee, con una prevalenza complessiva nella popolazione generale da 1:200 a 1:500. Le CMP, cardiomiopatia ipertrofica (CMI), cardiomiopatia dilatativa (CMD), cardiomiopatia aritmogena (CA), cardiomiopatia restrittiva (CMR) e ventricolo sinistro non compatto (LVNC), rappresentano una causa frequente di arresto cardiaco e morte improvvisa, in particolare nel bambino e nel giovane adulto[1,2]. Ad oggi sono noti oltre 100 geni le cui alterazioni possono associarsi alle CMP[3]. Il test genetico viene effettuato mediante sequenziamento di nuova generazione (*next generation sequencing*, NGS), tecnologia che ha reso possibile l'analisi di centinaia di geni in molti pazienti contemporaneamente, abbreviando i costi ed i tempi di esecuzione dell'analisi. Inoltre tale metodica risulta particolarmente adatta per patologie molto eterogenee come le CMP, data la presenza di mutazioni/varianti multiple nello stesso gene o in diversi geni (es. i genotipi complessi nel caso della CMI, oppure le forme digeniche nella CA) e la presenza di geni comuni fra due o più patologie (es. tra CMD e CA). Numerosi laboratori, pubblici e privati, hanno scelto di analizzare pannelli di geni diversi e molto estesi (oltre 100 geni), con lo scopo di identificare la variante causativa in un numero sempre più alto di pazienti. Tuttavia è stato osservato che, contrariamente all'atteso, il numero di pazienti caratterizzati è aumentato in modo limitato, con scarsa ricaduta sul piano clinico[3-5]. Inoltre, è incrementato notevolmente il numero di varianti con significato clinico incerto o sconosciuto (*variants of uncertain significance,* VOUS), varianti che non è possibile classificare né come causative né come benigne. Tali varianti costituiscono per il cardiologo un risultato inconclusivo e ambiguo. Per questi motivi, a scopo diagnostico, è indicato utilizzare un pannello ristretto di geni (geni *core*) selezionati per avere la massima sensibilità, spe-

© 2020 Il Pensiero Scientifico Editore
Ricevuto 29.04.2020; nuova stesura 10.06.2020; accettato 11.06.2020.
Gli autori dichiarano nessun conflitto di interessi.
Per la corrispondenza:
Dr.ssa Francesca Girolami S.O.C. Cardiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze
e-mail: francesca.girolami@meyer.it

cificità e validità clinica in modo da ottimizzare il rapporto costo-utilità del test e limitare il numero di VOUS e quindi di risultati inconcludenti. Nel pannello *core*, ad esempio, vengono selezionati solo i geni con forti o moderate evidenze di legame con la patologia e viene incoraggiata l'inclusione di geni responsabili di forme che possono entrare in diagnosi differenziale come *GLA*, *PRKAG2*, *TTR* o *LAMP2* nel caso ad esempio della CMI[3,6]. I geni vengono suddivisi come associati in modo forte, moderato o limitato con la patologia in base ai criteri di segregazione in ampie famiglie, alla presenza di studi funzionali e alla presenza/assenza in database di controllo di popolazione (es. Genome Aggregation Database gnomAD: https://gnomad.broadinstitute.org). Diverse iniziative come quella del consorzio americano Clinical Genome Resource (ClinGen; www.clinicalgenome.org) sono state intraprese al fine di verificare la validità clinica di molti geni tra cui quelli associati alle CMP, analisi che si è rivelata molto utile a supporto della scelta dei geni da includere nei pannelli per i laboratori di tutti il mondo[7,8]. Inoltre sono stati pubblicati diversi lavori con score CMP-specifici per "misurare" il grado di associazione di uno specifico gene[4].

Il pannello di geni *core* può essere ampliato in casi eccezionali, come in presenza di una famiglia ampia con numerosi affetti (in modo da poter segregare l'eventuale variante sconosciuta in un numero significativo di pazienti) od in presenza di fenotipi misti e fenotipicamente indistinguibili sul piano clinico. In alternativa all'analisi mediante pannelli di geni, può essere utilizzata l'analisi dell'esoma (*whole exome sequencing*, WES), ovvero della porzione codificante dell'intero genoma (circa 1-2%). In ambito pediatrico l'analisi WES è fortemente raccomandata date le caratteristiche peculiari dei piccoli pazienti con quadri clinici spesso sindromici e il numero crescente di nuovi geni identificati. Invece, nel caso delle principali CMP dell'adulto, l'approccio più utilizzato è di eseguire il WES per poi filtrare i geni di interesse in base all'indicazione clinica (pannelli "virtuali"). Questa modalità, che probabilmente rappresenterà l'evoluzione futura per patologie così eterogenee come le CMP, ha il vantaggio di poter rianalizzare il dato nel tempo, selezionando pannelli "virtuali" differenti in base all'insorgenza di nuove caratteristiche cliniche. È sempre necessario informare il paziente e ottenere il consenso informato alla nuova analisi.

Un notevole vantaggio dell'introduzione della tecnologia NGS è stata la possibilità di rianalizzare lo stesso dato di sequenziamento mediante opportuni algoritmi bioinformatici, per la presenza di piccole delezioni/inserzioni (1-20 bp) o grandi delezioni/inserzioni, estese fino a comprendere un intero gene (*copy number variation*, CNV). Tale analisi è indicata eseguirla a completamento del test NGS, in modo particolare per la CA (dove CNV sono state identificate soprattutto nel gene PKP2), per la CMD (dove sono coinvolti i geni come *LMNA*, *DMD*, *DSP*, *TTN*) e per alcuni geni delle fenocopie della CMI (geni *LAMP2* e *GLA*) al fine di incrementare la sensibilità del test. Occorre precisare che l'analisi NGS delle CNV deve essere confermata con una metodica alternativa validata per la diagnostica, come ad esempio la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), la Array-CGH (*comparative genomic hybridization*) o la reazione polimerasica a catena quantitativa[9].

Infine, il sequenziamento dell'intero genoma è invece ancora limitato ad un utilizzo esclusivo per la ricerca[3].

Cardiomiopatia ipertrofica

La CMI, la più frequente tra le CMP, è riconosciuta come malattia del sarcomero cardiaco e si manifesta prevalentemente nell'età adulta[10]. Il test genetico, eseguito per i principali geni sarcomerici e alcuni geni codificanti "fenocopie" (*GLA* responsabile della malattia di Fabry, *LAMP2* causativo di malattia di Danon, *TTR* associato ad amiloidosi, *PRKAG2* le cui alterazioni sono frequentemente causa di glicogenosi cardiaca), riesce ad identificare la variante causativa nel 30-60% dei casi (Tabella 1). Le "fenocopie" sono condizioni genetiche non causate da mutazioni in geni sarcomerici, che ricalcano comunque il fenotipo ipertrofico ma che costituiscono patologie molto diverse dalla CMI sia sul piano clinico che riguardo le modalità di trasmissione.

La resa è più bassa nelle forme non familiari. *MYH7* e *MYBPC3* sono i geni maggiormente mutati e rendono conto di circa l'80% delle mutazioni patogenetiche.

La CMI si trasmette con modalità autosomica dominante; quindi, la probabilità di trasmissione della variante causativa è del 50% per ciascun figlio indipendentemente dal sesso del nascituro. La CMI è caratterizzata da penetranza incompleta ed espressività variabile: ad esempio nel figlio di un paziente che ha ereditato la variante causativa, la malattia potrà anche non manifestarsi nel corso della vita oppure, al contrario, manifestarsi ad un'età precoce rispetto all'insorgenza nel genitore. Inoltre, ad una medesima variante si possono associare fenotipi diversi (da forme lievi, a moderate a severe di ipertrofia) sia all'interno della stessa famiglia che tra soggetti appartenenti a famiglie diverse. Pertanto, al momento, non sono note chiare associazioni genotipo-fenotipo; alcune evidenze mostrano che la presenza di genotipi complessi (due varianti nello stesso gene o in geni diversi), riscontrata in circa il 10% dei casi sia solitamente associata ad un decorso sfavorevole. Nelle forme ad esordio pediatrico, la CMI può associarsi a quadri sindromici (es. RASopatie) oppure a disordini metabolici (es. gene della malattia di Pompe) o mitocondriali. La resa è più bassa nelle forme non familiari.

Cardiomiopatia dilatativa

La CMD presenta eziologia eterogenea e solo nel 10-40% dei casi è possibile identificare una causa genetica. Nelle forme non familiari la resa del test genetico scende al 10-25%. I geni coinvolti sono principalmente sarcomerici, citoscheletrici o codificanti proteine nucleari (es. lamina A/C). A scopo diagnostico si analizzano pannelli di circa 16-20 geni, alcuni dei quali responsabili anche di CA[11]. Mutazioni troncanti nel gene *TTN* codificante per la proteina gigante titina sono responsabili fino ad un 25% dei casi, mentre varianti nel gene *LMNA* si riscontrano in circa il 5% dei pazienti con CMD, in genere associata a disturbi di conduzione. Si sottolinea l'importanza di valutare l'associazione di una CMD con altri segni clinici quali la debolezza muscolare e valori di creatinchinasi elevati, poiché si potrebbe trattare di una patologia neuromuscolare. Nello specifico il test genetico dovrà focalizzarsi sull'analisi dei geni DMD o EMD associati rispettivamente a distrofia di Duchenne-Becker e distrofia muscolare di Emery-Dreifuss. Un test genetico positivo in questo caso ha implicazioni cliniche diverse in quanto vengono diagnosticate forme sindromiche con modalità di trasmissione *X-linked*. Come per la CMI, nel caso di pazienti pediatrici è importante anche valutare geni associati a forme mitocondriali o sindromiche (es. distrofinopatie, sindrome di Alstrom, sindrome di Barth) (Tabella 1).

Tabella 1. Principali geni responsabili di cardiomiopatie.

Cardiomiopatia	Geni associati	Ereditarietà	Geni responsabili dell'ereditarietà di fenocopie	Geni responsabili di forme sindromiche*
CMI	*MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, TPM1, ACTC1, MYL2, MYL3, TTR, GLA, LAMP2, PRKAG2, PLN, ACTN2, CSRP3*	AD	*LAMP2* (malattia di Danon) X-linked *PRKAG2* (malattia AD da accumulo di glicogeno) *GLA* (malattia di Fabry) X-linked *mATTR* AD	*PTPN11, SOS1, HRAS, KRAS, BRAF* (RASopatie: Noonan, Costello)
CMD	*MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, TPM1, ACTC1, DES, DSG2, DSP, LMNA, PLN, TNNC1, TTN**, CSRP3, VCL ,TCAP, NEXN, RBM20, BAG3, SCN5A*	AD, AR	*DMD, EMD* (distrofinopatie) X-linked *LAMP2* (malattia di Danon) X-linked	*TAZ* (sindrome di Barth) *ALMS1* (sindrome di Alstrom)
CA	*DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, TMEM43, FLNC, DES*	AD, AR		*JUP* (sindrome di Naxos) *DSP* (sindrome di Carvajal)
CMR	Includere i geni *DCM*, *HCM*, *HFE*	AD, AR		
LVNC	*MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, TPM1, ACTC1, DES, LMNA, PLN, TNNC1, TTN, CSRP3, RBM20, LAMP2, PRKAG2, MYL2, MYL3, ZASP/LDB3, TAZ, TCAP, ACTN2, DTNA, SCN5A*	AD, AR, X-linked	*TAZ* (sindrome di Barth) X-linked	*PTPN11, SOS1, HRAS, KRAS, BRAF* (RASopatie: Noonan, Costello) Sindrome da delezione 1p36

AD, autosomica dominante; AR, autosomica recessiva; CA, cardiomiopatia aritmogena; CMD, cardiomiopatia dilatativa; CMI, cardiomiopatia ipertrofica; CMR, cardiomiopatia restrittiva; LVNC, ventricolo sinistro non compatto; mATTR, amiloidosi cardiaca da transtiretina mutata; X-linked, legata al cromosoma X.
*Tali forme sono ad esordio pediatrico, rare nell'adulto.
**Sono ritenute causative solo varianti tronche.

Cardiomiopatia aritmogena

La CA è causata da varianti nei geni codificanti desmosomi, tra i quali il prevalente risulta il gene *PKP2* (3%) codificante per la proteina placofillina, dove è descritta anche la presenza di CNV[12]. Il test genetico riesce ad individuare la variante causativa da un 10% ad un 50% dei casi con diagnosi clinica di CA. Sono descritte anche forme digeniche o casi di eterozigosi composta che complicano la consulenza genetica. Nel pannello di geni analizzato in diagnostica, varianti troncate o del tipo delezioni/inserzioni nel gene *DSP* codificante la proteina desmoplakina sono spesso associate a forme di CA biventricolare, cui possono associarsi quadri sindromici quali cheratoderma palmo-plantare o capelli lanosi (es. sindrome di Carvajal).

La CMD e la CA sono patologie con trasmissione autosomica dominante; solo raramente si osservano forme autosomiche recessive: ad esempio la sindrome di Naxos, dovuta a mutazioni nel gene *JUP,* o la sindrome di Carvajal, causata da alterazioni del gene *DSP* con trasmissione autosomica sia dominante che recessiva. Forme di CMD possono avere una trasmissione *X-linked*, ad esempio nel caso di mutazioni nel gene *DMD*. Alcuni di questi geni, presentano un effetto pleiotropico, ossia sono responsabili di forme diverse di CMP: i geni *DSP* e *DES* possono causare sia CMD che CA ed i geni sarcomerici possono essere responsabili sia di CMI che di CMD (Tabella 1).

Cardiomiopatia restrittiva

La CMR è una forma rara solitamente causata da mutazioni in geni associati a CMI o CMD (es. sarcomerici, desmina, filamina C). La resa del test genetico varia dal 10% al 60%. Nell'adulto può associarsi a emocromatosi (gene *HFE*) (Tabella 1). I casi pediatrici con CMR rappresentano il gruppo di pazienti più rari, ma anche quello con la prognosi più sfavorevole, spesso trattabile solo con il trapianto cardiaco.

Ventricolo sinistro non compatto

Il LVNC è un'entità discussa e solo in rari casi configura una CMP a sé stante, in genere associata ai geni che possono causare CMI o CMD. Più spesso la presenza di un ventricolo sinistro ipertrabecolato configura un *trait* aspecifico che si riscontra in situazioni fisiologiche (sport o gravidanza) o associato ad altre cardiopatie (CMI, CMD, forme congenite); in tali casi il test genetico non è indicato se non in relazione alla patologia associata. Nei rari casi di vero LVNC, in cui sia presente una familiarità, il test può essere considerato ma ha comunque una resa limitata (<10%, prevalentemente per mutazioni su geni sarcomerici) (Tabella 1).

Patologie in diagnosi differenziale con la cardiomiopatia ipertrofica

La presenza di caratteristiche multisistemiche, l'ipertrofia severa e una progressione precoce verso la CMD o la presenza di anomalie elettrocardiografiche come la preeccitazione ventricolare sono alcuni dei segni clinici che possono aiutare a distinguere malattie rare quali la malattia di Danon, di Fabry, la glicogenosi da *PRKAG2* e l'amiloidosi da transtiretina (TTR) dalla CMI sarcomerica. In questi casi il test genetico è fondamentale per evidenziare la causa della malattia.

Malattia di Danon

La malattia di Danon, da accumulo lisosomiale è causata da mutazioni nel gene *LAMP2*, localizzato sul cromosoma X. Ad oggi, più di 100 varianti sono state identificate come causa primaria della malattia e includono piccole delezioni/inserzioni, splicing e CNV. Le difficoltà diagnostiche portano a una sottostima della prevalenza, ma nonostante ciò mutazioni in *LAMP2* sono state trovate nell'1-8% dei pazienti, con sospetto di CMI, che si è sottoposto a test genetico. Nonostante l'ereditarietà legata al sesso, le femmine eterozigoti non sono asintomatiche, ma tendono a sviluppare una CMP a esordio più tardivo rispetto ai maschi. I maschi sviluppano fin dall'infanzia CMP (ipertrofia ventricolare simmetrica o asimmetrica), miopatia (con rialzo della creatinchinasi) e ritardo mentale da lieve a severo; nelle prime due decadi di vita non è raro lo scompenso cardiaco o la morte improvvisa. L'identificazione della mutazione a livello del gene *LAMP2* permette di individuare i portatori nei familiari degli affetti. La consulenza genetica è complicata dalla natura eterogenea della malattia, anche tra i maschi della stessa famiglia.

La diagnosi di malattia di Danon può essere confermata su biopsia muscolare.

Non vi è alcuna terapia medica specifica disponibile per tale condizione. Viene preso in considerazione l'impianto del defibrillatore e il trapianto cardiaco[13].

Malattia di Fabry

La malattia di Fabry è una malattia rara da accumulo lisosomiale. È caratterizzata da depositi intracellulari di glicosfingolipidi, determinata da mutazioni del gene *GLA* che codifica per l'alfa-galattosidasi A. Il gene è localizzato sul cromosoma X e pertanto la trasmissione genetica è *X-linked*. La malattia di Fabry interessa il sistema nervoso centrale e periferico così come il sistema cardiovascolare e renale, e si manifesta con angiocheratoma, acroparestesie dolorose, sintomi gastroenterici, cornea verticillata, che possono comparire anche in età infantile. In età adulta sono prevalenti l'interessamento cardiaco, renale e neurologico. In alcuni casi una CMP a fenotipo ipertrofico non ostruttivo può essere l'unico segno clinico della malattia (variante cardiaca). Il pericolo di vita sopraggiunge in terza o quarta decade ed è conseguente al coinvolgimento renale (proteinuria, insufficienza renale), cardiaco (ipertrofia cardiaca generalmente concentrica, bradi- e tachiaritmie, fibrillazione atriale, scompenso cardiaco), neurologico (attacco ischemico transitorio, ictus cerebrali ischemici ed emorragici).

L'eterozigosi, nelle pazienti femmine, può dar luogo ad un fenotipo estremamente variabile, da forme severe con esordio in età pediatrica a forme con esordio tardivo in età adulta, da forme oligo-asintomatiche e forme asintomatiche.

La diagnosi di malattia di Fabry si avvale della dimostrazione del deficit dell'alfa-galattosidasi A nei maschi emizigoti con conferma mediante analisi genetica; nelle femmine, dove il test enzimatico è spesso normale, la conferma diagnostica è genetica.

La diagnosi di malattia di Fabry prevede la possibilità di trattamento con terapia di sostituzione enzimatica, che consente di migliorare la prognosi ed aumentare l'aspettativa di vita[15]. È pertanto fondamentale riconoscere precocemente questa malattia.

Glicogenosi da PRKAG2

La glicogenosi da *PRKAG2* si trasmette con modalità autosomica dominante ed è dovuta a mutazioni prevalentemente *missense* e *nonsense* nel gene *PRKAG2* che codifica per la subunità γ della proteina chinasi AMP-attivata (AMPK).

I pazienti giungono alla diagnosi generalmente in giovane età (intorno ai 20 anni), in seguito all'insorgenza di dispnea, palpitazioni ed episodi sincopali. La morte improvvisa può rappresentare la prima manifestazione della malattia. Alterazioni elettrofisiologiche quali preeccitazione ventricolare (sindrome di Wolff-Parkinson-White), progressivo sviluppo di blocco atrioventricolare, alterazioni sinusali e fibrillazione atriale sono state riscontrate nella quasi totalità dei pazienti anche in assenza di un'ipertrofia ventricolare ecograficamente documentata. Morfologicamente la CMP è caratterizzata da ipertrofia ventricolare sinistra, simmetrica o asimmetrica, distinguibile dalle forme sarcomeriche per le disfunzioni sistoliche e per l'evoluzione verso la CMD. Le opzioni di trattamento comprendono l'impianto di pacemaker per i difetti di conduzione e talvolta il trapianto cardiaco per l'insufficienza cardiaca[14]. L'analisi genetica permette di evidenziare la causa della malattia e condurre il test a cascata nei familiari.

Cardiomiopatia amiloidotica familiare

Mutazioni nel gene della TTR possono condurre alla deposizione nello spazio extracellulare di depositi di materiale amiloide costituiti da TTR *misfolded*. Le mutazioni di TTR, trasmesse con modalità autosomica dominante, seguono una caratteristica distribuzione geografica; nel tratto appenninico tosco-emiliano è relativamente frequente la mutazione I68L, che è responsabile della grande maggioranza dei casi di amiloidosi cardiaca da TTR mutata (mATTR)[16]. Nella mATTR esiste una buona correlazione genotipo/fenotipo. Alcune mutazioni sono responsabili di manifestazioni cliniche di natura prevalentemente neurologica, altre di fenotipi misti neurologici e cardiologici (es. T49A, F64L, E89Q e V30M), altre ancora di fenotipi esclusivamente cardiologici, come V122I e la stessa I68L[17]. La mATTR si manifesta più frequentemente nel sesso maschile e nel corso della settima decade, con le caratteristiche dello scompenso cardiaco e della CMR[18]. Il test genetico può essere di grande utilità, insieme ad alcune metodiche di imaging come la scintigrafia con difosfonati e la risonanza magnetica cardiaca, per distinguere la mATTR dalla CMI e dall'amiloidosi da TTR *wild-type* (wtATTR). Una corretta identificazione dei pazienti con mATTR è di fondamentale importanza, dal momento che esistono opzioni di trattamento farmacologico (es. il tafamidis, uno stabilizzatore del tetramero di TTR, e il patisiran, uno *small interfering RNA*) e non farmacologico, come il trapianto di fegato[19,20].

DIAGNOSI GENETICA

Utilità del test genetico

Il test genetico nei pazienti con CMP offre le seguenti opportunità:

- evidenziare la causa genetica della CMP;
- ricerca/esclusione di fenotipi rari (alcuni dei quali come la malattia di Fabry e l'mATTR, passibili di terapie specifiche);
- studio familiare (test a cascata);
- accesso alla consulenza genetica.

Invece, per quanto riguarda la stratificazione del rischio, il test genetico presenta delle importanti limitazioni. Infatti, contrariamente a quanto riportato dai primi studi degli anni

'90, questo obiettivo è possibile solo per un piccolo numero di varianti e di geni associati in modo ricorrente con decorso sfavorevole (es. laminopatie [*LMNA*], desminopatie [*DES*] o alcune mutazioni delle troponina T [*TNNT2*] o troponina I [*TNNI3*] o della beta-miosina [*MYH7*]). Nella gran parte dei pazienti, la correlazione tra genotipo e prognosi è vaga o addirittura inesistente. Risulta importante non dare ai pazienti aspettative irrealistiche su questo aspetto (Figura 1).

Modalità di esecuzione

Nelle CMP il test genetico è un processo che si esegue in due stadi. Nel primo viene eseguita l'analisi genetica nel probando o caso indice; tale analisi prevede lo studio di un pannello di geni *core* (Tabella 1) al fine di ricercare la variante causativa (variante patogenetica o probabilmente patogenetica). Solo se questa viene identificata, si procede con il secondo stadio che prevede la ricerca della variante nota nei familiari del probando (test a cascata) (Figura 2).

Analisi genetica del probando

In questo primo stadio viene analizzato il DNA del probando. Per probando si intende l'individuo con il fenotipo più severo della famiglia e che di solito viene per primo all'attenzione del clinico.

Il test genetico deve essere eseguito nel contesto di una consulenza genetica che si suddivide in pre-test e post-test. Durante la consulenza genetica pre-test viene eseguita la raccolta dell'albero genealogico, la spiegazione delle modalità di esecuzione del test, dei possibili risultati, l'utilità ed i limiti del test. Durante tale colloquio viene raccolto il consenso informato e viene effettuato un prelievo di sangue da cui estrarre il DNA. La consulenza genetica post-test permette di comunicare e discutere i risultati del test e le eventuali ricadute del risultato del test sui familiari. Si raccomanda un approccio multidisciplinare, con il coinvolgimento di cardiologi specializzati nelle CMP, genetisti clinici e di laboratorio.

Analisi genetica nei familiari

Il test a cascata nei familiari è un test genetico predittivo che permette di identificare i familiari del probando che sono a rischio di sviluppare la malattia. Si tratta di soggetti che non manifestano il fenotipo clinico, ma hanno ereditato la variante predisponente alla patologia. Per questi individui è indicata una stretta sorveglianza clinica nel tempo. La ricerca del-

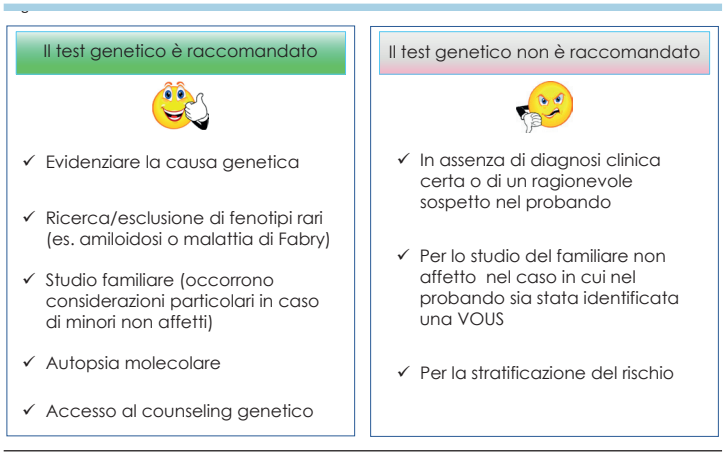

Figura 1. Indicazioni al test genetico.
VOUS, varianti con significato clinico incerto o sconosciuto.

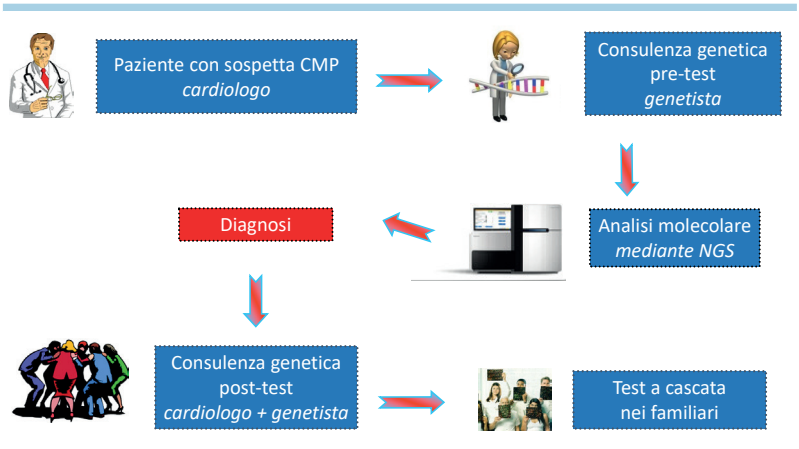

Figura 2. Modalità di esecuzione del test genetico.
CMP, cardiomiopatia; NGS, sequenziamento di nuova generazione.

la variante familiare deve essere eseguita prima nei familiari di primo grado (figli o fratelli/sorelle del probando), per poi proseguire eventualmente nelle generazioni successive (test a cascata). Prerequisito per poter eseguire il test a cascata è l'aver individuato una variante patogenetica o probabilmente patogenetica nel probando; infatti, non è indicato eseguire la ricerca nei familiari di una VOUS, dato il significato inconclusivo del test. È molto importante sottolineare che questi soggetti, genotipo positivo/fenotipo negativo, potranno a loro volta trasmettere la variante al 50% dei figli. Al contrario, nel caso in cui il familiare risulti non aver ereditato la variante causativa, il rischio di ammalarsi risulterà trascurabile e poiché la variante non potrà ricomparire nelle generazioni successive si interromperà la trasmissione della malattia.

Indicazione all'accesso

Analisi genetica del probando

Si raccomanda di richiedere il test genetico solo in caso di diagnosi certa o in presenza di un fondato sospetto clinico, come indicato dalle apposite linee guida internazionali[21]. Si sottolinea che l'esecuzione inappropriata di un test genetico comporta un aggravio dei costi per il Sistema Sanitario Nazionale ed un aumento generale dei tempi di esecuzione dei test per quel laboratorio. È estremamente importante che venga formulato un sospetto clinico quanto più accurato possibile prima dell'invio dei pazienti all'esame genetico. Demandare all'esame genetico una diagnosi eziologica in fenotipi mal caratterizzati/dubbi o comunque, in assenza di un sospetto clinico definito, aumenterà necessariamente il rischio di un risultato dubbio del test. Pertanto, l'esame genetico deve seguire un minimo di accertamenti diagnostici sul caso indice e sulla famiglia; come già espresso nei precedenti paragrafi, la presenza di un tratto ereditario dimostrabile aumenta fortemente la resa e la specificità del test. Le linee guida internazionali raccomandano che, ove possibile, la diagnosi sia formulata da cardiologi esperti in malattie genetiche cardiovascolari.

Per quanto riguarda il timing del test genetico, ovvero quando testare il probando, non vi sono indicazioni particolari; tuttavia, poiché il risultato del test può essere utilizzato nella gestione clinica, viene suggerito di indicare l'esecuzione del test genetico al momento stesso in cui viene formulata la diagnosi clinica. È importante sottolineare che, in caso di test genetico negativo e a fronte di una diagnosi ben definita, è indicato ripetere l'analisi genetica nel tempo, poiché il risultato del test potrebbe cambiare per l'acquisizione di nuove conoscenze, quali ad esempio l'identificazione di nuovi geni o di nuovi meccanismi molecolari.

Inoltre, si sottolinea che non è indicato eseguire il test come probando in persone non affette, anche se con storia familiare positiva. Ad esempio, viene spesso richiesto un parere riguardo all'esecuzione di test genetico nei familiari di soggetti deceduti improvvisamente, con diagnosi autoptica di CMP acclarata o sospetta. Tuttavia, a meno di non ricorrere a un test genetico su materiale autoptico che consenta una diagnosi sul soggetto stesso (autopsia molecolare), non è indicato procedere a studio genetico dei consanguinei. Uno dei principali motivi è che per interpretare un test genetico è indispensabile correlare la variante identificata con la malattia in studio e il riscontro di una variante in un soggetto sano non rende possibile provare questa evidenza. Nel caso in cui, quindi, venisse effettuato un test genetico in questo contesto, potremmo solo ipotizzare di aver identificato la variante responsabile di morte improvvisa, ma senza poterla testare in un soggetto deceduto della stessa famiglia non potremmo dimostrane l'effettivo coinvolgimento. È molto importante quindi che qualora ci si trovi in un quadro di familiarità per morte improvvisa, con diagnosi autoptica di CMP, che i familiari siano valutati mediante screening cardiologico completo (ecocardiogramma, elettrocardiogramma e risonanza magnetica); infatti qualora si identificasse la stessa CMP in un familiare, quest'ultimo diventerebbe il "nuovo" probando per l'esame genetico, il "gold standard" per eseguire il test genetico.

Si sottolinea che la resa e quindi l'utilità del test genetico è influenzata da diversi fattori; la probabilità di individuare la variante causativa è massima in presenza di pazienti giovani con fenotipi classici e familiarità. In questo caso abbiamo anche la massima utilità clinica, e cioè la possibilità di beneficiare del test a cascata per i familiari. Al contrario in presenza di un paziente anziano con fenotipo ambiguo (es. una lieve ipertrofia in un soggetto con ipertensione nota), la resa del test genetico si riduce molto, soprattutto se non ci sono altri affetti in famiglia (forme sporadiche).

Analisi genetica nei familiari

L'esecuzione del test a cascata nei familiari si basa sul presupposto di aver precedentemente identificato il difetto genetico responsabile del quadro clinico del probando. Non deve essere eseguito nel caso in cui nel probando siano state identificate VOUS o nel caso in cui il test nel probando sia risultato negativo.

Metodi utilizzati

Il test genetico a scopo diagnostico per le varie CMP viene eseguito mediante tecnologia NGS, metodica di sequenziamento che permette di analizzare numerosi geni contemporaneamente in gruppi di pazienti; l'NGS ha migliorato il processo diagnostico diminuendo i tempi ed i costi per raggiungere una diagnosi molecolare, modificando talvolta le scelte terapeutiche[22]. Tale tecnologia prevede una fase di laboratorio in cui a partire da un campione di sangue viene estratto il DNA genomico e vengono preparate le librerie solitamente mediante digestione enzimatica (collezione di frammenti di DNA che, messi insieme, formano l'intero genoma). Successivamente vengono selezionati e amplificati solo i frammenti costituenti i geni da analizzare (fase di arricchimento) e ne viene eseguito il sequenziamento su piattaforme ad alta processività. I dati ottenuti sono analizzati con strumenti bioinformatici in modo da ottenere per ciascun paziente una lista contenente tutte le varianti presenti nei geni indagati ed arrivare tramite un processo di filtraggio all'identificazione della variante causativa. L'analisi di molti geni contemporaneamente ha portato ad identificare numerose varianti per ciascun paziente rendendo il processo interpretativo (inteso come la ricerca della variante causativa) molto complesso. Per questo è richiesto personale dedicato esperto nella genetica delle CMP ed è fondamentale l'interazione con il cardiologo di riferimento. Per tali motivi è opportuno che il test genetico sia eseguito in centri dedicati, dove i vari professionisti possono lavorare insieme (es. strutture di Cardiogenetica).

Risultati attesi ed implicazioni cliniche

Il test genetico può avere quattro possibili risultati, ciascuno con diverse implicazioni cliniche (Figura 3):

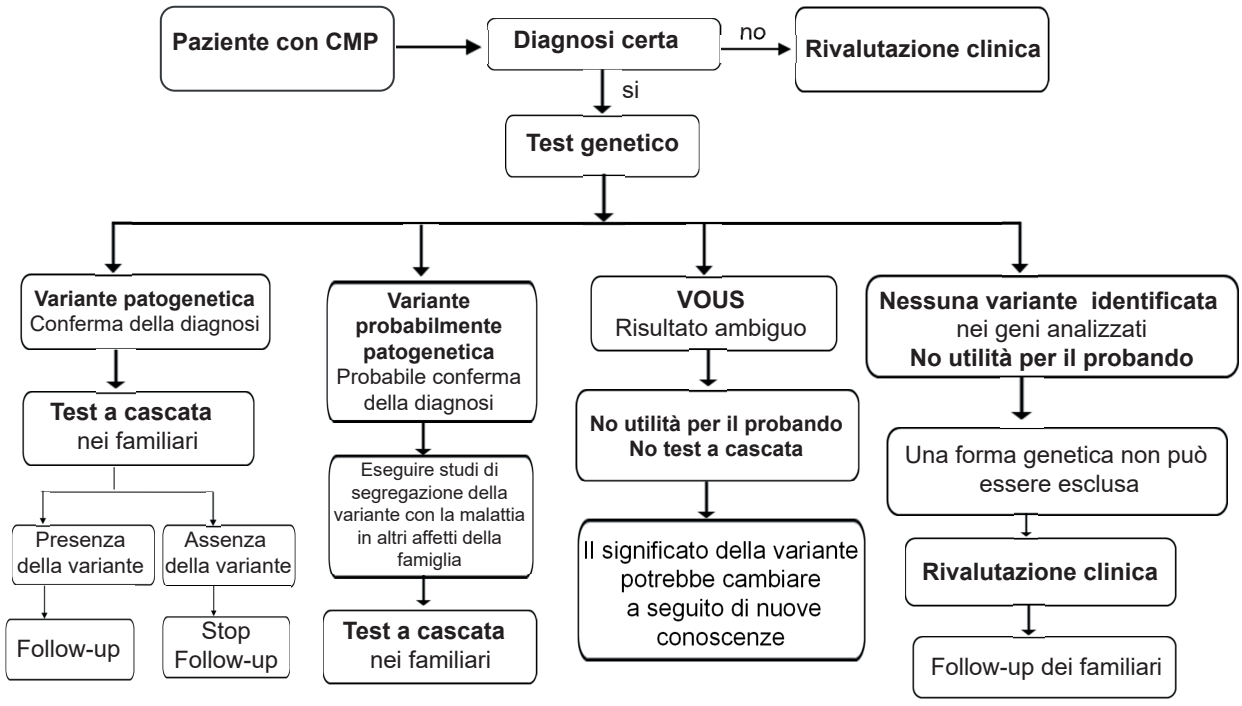

Figura 3. Possibili risultati del test genetico ed implicazioni cliniche.
VOUS, varianti con significato clinico incerto o sconosciuto.

1. Identificazione di una o più varianti di sequenza chiaramente interpretabili come causa della patologia (varianti patogenetiche). In questo scenario la causa genetica della CMP risulta identificata nel paziente ed è indicato eseguire il test a cascata nei familiari. L'identificazione della variante causativa nel probando può in rari casi avere come conseguenza la necessità di una rivalutazione clinica (es. identificazione di una variante nel gene Fabry in un paziente con indicazione al test genetico per CMI).
2. Identificazione di una o più varianti di sequenza interpretabili come probabile causa della patologia (varianti probabilmente patogenetiche). In questo scenario la causa genetica della CMP è molto probabile che sia stata identificata. È indicato testare quando possibile la segregazione della variante in altri membri affetti della famiglia. È particolarmente importante che lo studio sui familiari sia eseguito unitamente alla valutazione cardiologica. Successivamente è possibile eseguire il test predittivo a cascata sui familiari.
3. Identificazione di una o più varianti di sequenza che sono rare e di cui non si può escludere un ruolo patogenetico, ma il cui significato non è immediatamente chiaro. In questo caso le varianti sono VOUS ed il risultato del test risulta ambiguo ed inconclusivo sul piano clinico. L'identificazione di una VOUS non ha rilevanza clinica per il paziente e non deve essere seguita dal test a cascata nei familiari.
4. La variante causativa della malattia non viene identificata, ovvero vengono identificate solo varianti benigne. Questo non esclude che la patologia abbia una base genetica in quanto i geni analizzati sono responsabili solo di un 10-60% dei casi a seconda del tipo di CMP. In questo scenario non è indicato analizzare eventuali familiari. Dato che non è possibile escludere che la malattia abbia una patogenesi ereditaria, i familiari del paziente dovranno comunque essere seguiti mediante un regolare follow-up clinico nel tempo (es. nei soggetti adulti con CMI è consigliabile un controllo ogni 5 anni circa, mentre in età adolescenziale i controlli sono in genere più frequenti, ad esempio ogni 2 anni).

Tutti questi scenari e le loro implicazioni cliniche devono essere discussi durante la consulenza genetica post-test, in presenza del genetista e del cardiologo (Figura 2).

Il test genetico nel minore asintomatico

In merito alla possibilità di eseguire il test genetico nei familiari sani di un probando con CMP è da notare che, nel caso di soggetti minorenni, non vi è indicazione ad eseguire il test a scopo predittivo per tutte quelle patologie in cui non è possibile intervenire con terapie o interventi al fine di prevenire l'insorgenza della patologia stessa[23,24]. Nel caso della CMI le linee guida della Società Europea di Cardiologia raccomandano di non iniziare lo screening prima dei 10 anni e di valutare caso per caso soprattutto in base alla storia familiare o di morte improvvisa o l'eventuale partecipazione a sport agonistico[10]; le linee guida dell'American College of Cardiology/American Heart Association raccomandano il test non prima dei 12 anni. Nel caso di canalopatie, le linee guida dell'Heart Rhythm Society raccomandano di eseguire il test genetico non prima dei 4 anni[21,22,24,25].

In generale, il test genetico nei minorenni in assenza di un quadro clinico fortemente sospetto e indicativo di patologia genetica è una questione da prendere in considerazione con molta cautela ed è necessario approfondire le implicazioni psicologiche e la rilevanza clinica di un'eventuale diagnosi.

Caso per caso, devono essere valutati i benefici e gli svantaggi che il test predittivo può dare, senza generalizzare. Salvo casi particolari, se non ci sono ricadute cliniche immediate (come in alcune canalopatie, nelle laminopatie, in alcune famiglie con CA oppure in un contesto di forte familiarità per morte improvvisa), è consigliabile rimandare la decisione sul test alla maggiore età, preservando in tal modo il "diritto di non sapere" e la qualità di vita laddove non ci siano decisioni cliniche da prendere nell'immediato. L'analisi molecolare viene invece proposta, dopo acquisizione di consenso informato, in presenza di quadro ecocardiografico manifesto o altri segni clinici sospetti.

Modalità di accesso al test

Sono possibili diverse modalità di accesso al test genetico per le CMP:

- Per il cardiologo che non lavora in una struttura di riferimento per le CMP è consigliato inviare il paziente ad una struttura di Genetica Medica dove il genetista clinico esegue una visita di genetica medica e prescrive il test genetico.
- Nel caso di un paziente con ipotesi diagnostica specifica già formulata dal cardiologo, la consulenza genetica associata al test può essere eseguita dal biologo specialista in genetica medica. Questa modalità, possibile solo in alcune Regioni, come ad esempio la Toscana, viene eseguita soltanto in centri multispecialistici dedicati dove il cardiologo ed il genetista lavorano a stretto contatto.
- Il cardiologo può inviare direttamente il prelievo con il consenso informato e la prescrizione del test genetico al laboratorio di riferimento. Tale modalità, possibile solo in alcune Regioni, è però scoraggiata perché non si avvale del valore aggiunto della consulenza genetica.

Costo del test genetico

Presso le strutture del Sistema Sanitario Nazionale l'esecuzione del test genetico negli adulti prevede solitamente il pagamento di un ticket il cui importo è variabile.

Tempi di esecuzione

Anche i tempi di esecuzione del test genetico nel probando mediante NGS sono variabili: da 1 a 6 mesi per il probando e da 2 settimane a 2 mesi per il familiare. Tali tempistiche sono dichiarate nel consenso informato e/o nell'informativa associata.

CONCLUSIONI

Il test genetico per le CMP gioca un ruolo cruciale nella diagnosi del probando e nella gestione dei familiari a rischio, ma il suo uso richiede la rigida applicazione di criteri di appropriatezza. Talvolta, nei casi in cui il test genetico conferma la presenza di una patologia rara, l'analisi genetica permette di indirizzare la terapia. L'impatto sulla stratificazione del rischio e sulla prognosi è limitato. L'interpretazione del test, quindi la classificazione delle varianti, ha un ruolo determinante per la gestione clinica e richiede una stretta collaborazione tra i vari specialisti in particolare il cardiologo, il genetista di laboratorio ed il genetista clinico che dovrebbero lavorare a diretto contatto in centri dedicati di Cardiogenetica. Quanto maggiore sarà la precisione della diagnosi pre-test con cui i pazienti vengono inviati, tanto maggiore sarà l'accuratezza e la pregnanza clinica della risposta.

RIASSUNTO

Le cardiomiopatie ereditarie, cardiomiopatia ipertrofica, cardiomiopatia dilatativa, cardiomiopatia aritmogena, cardiomiopatia restrittiva e ventricolo sinistro non compatto, sono patologie clinicamente e geneticamente molto eterogenee, e rappresentano una causa frequente di arresto cardiaco e morte improvvisa. Ad oggi, sono noti oltre 100 geni le cui alterazioni possono associarsi all'insorgenza di cardiomiopatie. Il test genetico viene effettuato mediante sequenziamento di nuova generazione, tecnologia che ha reso possibile l'analisi di centinaia di geni in molti pazienti contemporaneamente, abbreviando i costi ed i tempi di esecuzione. Tuttavia, l'impiego delle nuove metodiche di sequenziamento ha fatto emergere nuove problematiche riguardanti le indicazioni all'accesso al test, l'interpretazione del dato e le implicazioni cliniche dei risultati.

Il presente documento ha lo scopo di rappresentare uno strumento operativo di supporto ai cardiologi ospedalieri per rendere più fruibile e appropriato l'utilizzo del test genetico per i propri pazienti con sospetta o accertata cardiomiopatia ereditaria.

Parole chiave. Analisi genetica; Cardiomiopatia; Genetica; Sequenziamento di nuova generazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Braunwald E. Cardiomyopathies: an overview. Circ Res 2017;121:711-21.
2. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J 2008;29:270-6.
3. Hershberger RE, Givertz MM, Ho CY, et al.; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. Genetic evaluation of cardiomyopathy: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med 2018;20:899-909.
4. Mazzarotto F, Girolami F, Boschi B, et al. Defining the diagnostic effectiveness of genes for inclusion in panels: the experience of two decades of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy at a single center. Genet Med 2019;21:284-92.
5. Alfares AA, Kelly MA, McDermott G, et al. Results of clinical genetic testing of 2912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: expanded panels offer limited additional sensitivity. Genet Med 2015;17:880-8.
6. Bean LJ, Funke B, Carlston CM, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report – a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med 2019;22:453-61.
7. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, et al. Evaluating the clinical validity of gene-disease associations: an evidence-based framework developed by clinical genome resource. Am J Hum Genet 2017;100:895-906.
8. Ingles J, Goldstein J, Thaxton C, et al. Evaluating the clinical validity of hypertrophic cardiomyopathy genes. Circ Genom Precis Med 2019;12:e002460.
9. Ho CY, Charron P, Richard P, et al. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. Cardiovasc Res 2015;105:397-408.
10. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, et al. ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and

Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2014;35:2733-79.
11. Mazzarotto F, Tayal U, Buchan RJ, et al. Reevaluating the genetic contribution of monogenic dilated cardiomyopathy. Circulation 2020;141:387-98.
12. Towbin JA, McKenna WJ, Abrams DJ, et al. HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy: executive summary. Heart Rhythm 2019;16:e373-407.
13. Maron BJ, Roberts WC, Arad M, et al. Clinical outcome and phenotypic expression in LAMP2 cardiomyopathy. JAMA 2009;301:1253-9.
14. Banankhah P, Fishbein GA , Dota A, Ardehali R. Cardiac manifestations of PRKAG2 mutation. BMC Med Genet 2018;19:1.
15. Arends M, Wijburg FA, Wanner C, et al. Favourable effect of early versus late start of enzyme replacement therapy on plasma globotriaosylsphingosine levels in men with classical Fabry disease. Mol Genet Metab 2017;121:157-61.
16. Gagliardi C, Perfetto F, Lorenzini M, et al. Phenotypic profile of Ile68Leu transthyretin amyloidosis: an underdiagnosed cause of heart failure. Eur J Heart Fail 2018;20:1417-25.
17. Rapezzi C, Quarta CC, Obici L, et al. Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: an Italian perspective. Eur Heart J 2013;34:520-8.
18. Ruberg FL, Grogan M, Hanna M, Kelly JW, Maurer MS. Transthyretin amyloid cardiomyopathy: JACC state-of-the-art review. J Am Coll Cardiol 2019;73:2872-91.
19. Emdin M, Aimo A, Rapezzi C, et al. Treatment of cardiac transthyretin amyloidosis: an update. Eur Heart J 2019;40:3699-706.
20. Solomon SD, Adams D, Kristen A, et al. Effects of patisiran, an RNA interference therapeutic, on cardiac parameters in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. Circulation 2019;139:431-43.
21. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA Expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). Europace 2011;13:1077-109.
22. Girolami F, Frisso G, Benelli M, et al. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. J Cardiovasc Med (Hagerstown) 2018;19:1-11.
23. Girolami F, Morrone A, Brambilla A, et al. Genetic testing in pediatric cardiomyopathies: implications for diagnosis and management. Prog Pediatr Cardiol 2018;51:24-30.
24. European Society of Human Genetics. Genetic testing in asymptomatic minors: recommendations of the European Society of Human Genetics. Eur J Hum Genet 2009;17:720-1.
25. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, et al.; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; American Society of Echocardiography; American Society of Nuclear Cardiology; Heart Failure Society of America; Heart Rhythm Society; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Thoracic Surgeons. 2011 ACCF/AHA Guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation 2011;124:2761-96.