

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI**

Ciclo XXXII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/M2

Settore Scientifico disciplinare: MED/43

Morte cardiaca improvvisa giovanile: diagnosi autoptica come strumento
di medicina preventiva.

Ruolo della Medicina Legale nel Progetto “Morte Improvvisa giovanile -
Emilia-Romagna”

Presentata da: Dott.ssa Federica Fersini

Coordinatore Dottorato:

**Chiarissimo
Prof. Fabio Piscaglia**

Supervisore:

**Chiarissima
Prof.ssa Susi Pelotti**

Esame Finale anno 2020

Sommario

Introduzione	3
<i>1 Capitolo</i>	5
Morte cardiaca improvvisa giovanile	5
1.1 Definizione ed epidemiologia.....	5
1.2 Substrati morfologici e fattori di rischio.....	8
1.3 Cause strutturali cardiache.....	11
Cardiopatia ischemica e CAD.....	11
Cardiomiopatia non ischemica.....	11
Miocarditi.....	13
Valvulopatie.....	14
Anomalie congenite delle arterie coronarie	14
Malattie cardiache non strutturali geneticamente determinate:	14
Disordini elettrici primari	15
<i>2 Capitolo</i>	17
2.1 Morte cardiaca improvvisa giovanile: diagnosi autoptica come strumento di medicina preventiva	17
2.2 Decremento del numero di autopsie. Problematica emergente	18
2.3 Dati anamnestici e circostanziali	21
2.4 Procedura autoptica	22
Esame esterno	24
Autopsia completa con approccio sequenziale alla morte improvvisa	25
Esame macroscopico standard del cuore	25
Esame istologico standard del cuore.....	27
Documentazione fotografica	28
Imaging post-mortem.....	28
Indagini laboratoristiche aggiuntive:	28
Biochimica	30
Microbiologia.....	31
2.5 SUD (Sudden unexplained death)	32
2.6 Autopsia molecolare dei casi di SUD: test genetici predittivi.....	34
Geni candidati	36
Materiale biologico da sottoporre ad analisi	37
Ulteriori analisi nei casi di SUD:	37
Farmacogenetica: applicazioni cliniche e risvolti medico-legali.....	38

2.7	Consenso Informato: un problema etico e medico-legale	40
	Screening genetico dei familiari del deceduto – consenso informato.....	42
	“ <i>Incidental findings</i> ”	48
3	<i>Capitolo</i>	51
	Approccio Multidisciplinare nei casi di MCI	51
	Ruolo della medicina legale all’interno del “Progetto Morte Improvvisa giovanile” Emilia – Romagna	51
3.1	Background e obiettivo dello studio:.....	51
3.2	Materiali e metodi.....	57
3.3	Risultati.....	61
3.4	Discussione.....	74
	Conclusioni	79
	Bibliografia	81
	Ringraziamenti	91

Introduzione

La presente tesi di dottorato si pone come obiettivo quello di analizzare il ruolo della Medicina Legale e della diagnosi autoptica in casi di Morte Cardiaca Improvvisa (MCI) come strumento di medicina preventiva. Questo mediante una collaborazione interdisciplinare tra medici legali, patologi specializzati in patologia cardiovascolare, cardiologi e genetisti clinici e molecolari che si collochi in un contesto istituzionale e lavori in stretto contatto con l’Autorità Giudiziaria, che in numerosi casi entra in rapporto con questi decessi.

A causa della modalità del decesso, improvvise e imprevedute, le MCI si verificano infatti più frequentemente fuori dall'ospedale e le autopsie sono per la maggior parte dei casi eseguite da patologi forensi, che si attengono alle richieste e indicazioni dell’Autorità Giudiziaria anche per escludere ipotesi di reato.

La morte cardiaca improvvisa è una tematica di estrema rilevanza per della salute pubblica, con importanti ripercussioni sociali. Tuttavia, nonostante le raccomandazioni e i vantaggi di un approccio integrato e multidisciplinare mancano procedure e protocolli condivisi in tutto il territorio italiano ed europeo.

Con queste premesse, è stato avviato a Bologna un progetto, “Morte improvvisa giovanile”, finanziato dalla fondazione Fanti Melloni – Unibo, con l’intento di diagnosticare e prevenire casi di morte improvvisa inspiegata nei giovani, specialmente di origine cardiaca, mettere in atto una rete multidisciplinare e definire protocolli standardizzati nella regione Emilia-Romagna.

Nel presente lavoro sarà proposto un inquadramento generale della MCI sulla base della letteratura scientifica in materia illustrando l’epidemiologia ed i fattori di rischio del fenomeno, e con un particolare riferimento cause di MCI, distinte in strutturali e aritmiche, ed ai meccanismi fisiopatologici connessi. Inoltre, verranno illustrate cause non cardiache di morte improvvisa.

Verranno poi trattati gli aspetti medico-legali con particolare riferimento al sul ruolo che l’autopsia riveste all’interno del percorso diagnostico, infatti sulla base dei reperti riscontrati all'esame necrosettoria è possibile inoltre selezionare i casi da sottoporre a ulteriori indagini, fra cui quelle genetiche per malattie cardiache ereditarie.

Verranno illustrate le nuove linee guida AECVP (Association for European Cardiovascular Pathology), realizzate nel 2017 per l’indagine autoptica della MCI, ponendo particolare attenzione alla necessità di un approccio diagnostico multidisciplinare che coinvolge

numerosi specialisti. Inoltre, verrà approfondito il ruolo chiave che oggi riveste l'autopsia molecolare, illustrando i geni candidati, le nuove tecniche NGS e i nuovi studi farmacogenetici.

Verranno inoltre riportati i progressi nel campo della biologia molecolare e della genetica umana che hanno permesso di identificare l'origine genetica di molte malattie cardiache responsabili di morte cardiaca improvvisa giovanile. Verrà trattato il tema del consenso informato con riferimento ai temi etici in merito all'esecuzione di test genetici sulle vittime e sui familiari con il tema dei risultati a di varianti a significato sconosciuto. In ultimo, verranno presentati i piani di screening e prevenzione che devono essere messi in atto sui familiari delle vittime al fine di ridurre l'incidenza di questi tragici eventi.

Infine, nel capitolo relativo al lavoro di ricerca sarà illustrato il Progetto Morte Improvvisa giovanile, gli obiettivi che si pone e come è strutturato. Verrà analizzata la casistica di ambito medico legale dall'inizio del progetto sino ad oggi, valutandola nell'ottica di una collaborazione multidisciplinari tra patologi forensi e altri esperti in campo medico (genetisti clinici, consulenti genetici, cardiologi, tossicologi e microbiologi). L'attenzione sarà rivolta ai risultati della nostra casistica dopo autopsia tradizionale integrata con autopsia molecolare anche alla luce delle varianti geniche sottolineando il ruolo che la genetica riveste nelle MCI anche a livello familiare al fine di intervenire in maniera coordinata anche nei confronti dei familiari della vittima di SUD, operando quindi in termini di prevenzione e di salute pubblica.

1 Capitolo

Morte cardiaca improvvisa giovanile

1.1 Definizione ed epidemiologia

La Morte Cardiaca Improvvisa (MCI) o *Sudden Cardiac Death* (SCD) è internazionalmente riconosciuta e definita come il decesso che avviene per cause cardiache, entro 1 ora dall'insorgenza dei sintomi in un soggetto apparentemente sano o in cui la cui malattia non era così grave da far prevedere un *exitus* così repentino^{1,2,3}. Un'accezione più allargata e maggiormente aderente alla pratica clinica e forense include ragionevolmente anche le morti occorse senza testimoni in soggetti di cui era noto lo stato di buona salute nelle 24 ore precedenti il decesso⁴.

Le sue caratteristiche principali sono legate alla genesi non traumatica ed alla rapida precipitazione degli eventi, che sono da ascrivere ad aritmie cardiache maggiori che producono, in ultima analisi, l'arresto cardiaco e cardiocircolatorio.

La morte cardiaca improvvisa è la causa prevalente di morte improvvisa nei bambini, negli adolescenti e nei giovani adulti (fino ai 35-40 anni) nei quali spesso che si verifica spesso in soggetti apparentemente sani, come prima manifestazione di una patologia sottostante non nota. In circa la metà dei giovani tra 1 e 35 anni che muoiono improvvisamente, infatti, non sono identificabili all'anamnesi precedenti segni premonitori o di allarme, e la morte rappresenta quindi l'evento "sentinella"⁵.

Costituisce quindi una tematica di estrema rilevanza per la salute pubblica, con importanti ripercussioni sociali perché può riguardare anche le fasce medio-giovani della popolazione, con un conseguente impatto devastante sulle famiglie⁶.

¹ Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, et al. *Task Force sulla morte cardiaca improvvisa*, Società Europea di Cardiologia. *Ital Heart J Suppl* 2002; 3: 1051-65.

² Myerburg RJ, Castellanos A 1980; *Task-force on SD of ESC*. *Eur Heart J* 2001; 22: 1374-1450

³ Goldstein S (1982) *The necessity of a uniform definition of sudden coronary death: witnessed death within 1 hour of the onset of acute symptoms*. *Am Heart J* 103:156-159

⁴ Kuriachan, V. P., Sumner, G. L. & Mitchell, L. B. Sudden Cardiac Death. *Current Problems in Cardiology* 40, 133-200 (2015).

⁵ C. Autore, E. Pagannone, F. Re2, et. Al. Screening cardiologico delle famiglie con storia di morte improvvisa giovanile: quali patologie ricercare e con quali strumenti. (*G Ital Cardiol* 2010; 11 (7-8): 557-565)

⁶ van der Werf, C., van Langen, I. M. & Wilde, A. A. M. Sudden Death in the Young: What Do We Know About It and How to Prevent? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 3, 96-104 (2010).

Le maggiori difficoltà nell'interpretazione dei dati epidemiologici sulla morte improvvisa sono la mancanza di standardizzazione nella codifica dei certificati di morte e la variabilità nella definizione di morte improvvisa.

La prevalenza della MCI è alta; da 3 a 4 milioni di persone in tutto il mondo ogni anno. Nonostante sia la principale causa di morte in tutti i paesi dell'unione europea, Canada e USA, l'esatta incidenza è sconosciuta e generalmente si ritiene sia sottostimata

Negli Stati Uniti l'incidenza annuale stimata varia da 180.000 a > 450.000 decessi. Uno studio condotto dalla Società Europea di Cardiologia riferisce da 36 a 128 decessi ogni 100.000 abitanti all'anno; i dati più recenti forniscono 37-53 decessi per 100.000 persone all'anno. In Italia l'incidenza riportata è di 0,53-0,67/1000 individui/anno nella fascia di età da 35 a 64 anni. L'incidenza aumenta con l'età consensualmente al crescere della malattia aterosclerotica coronarica: negli adolescenti e giovani adulti (età < 35 anni), l'incidenza approssimativa è di 0.01/1000/per anno; nei soggetti di 35-40 anni aumenta a circa 1/1000/anno, fino a raggiungere un'incidenza di 2/1000/anno fino all'età dei 60 anni e di 200/1000/anno nella popolazione più anziana.

Nel nostro Paese dai dati ottenuti dallo studio MONICA, condotto in Brianza tra il 1985 e il 1998, l'incidenza di MCI in Italia è di 0,95/1000 abitanti/anno, pari a 40-50.000 eventi ogni anno. Evidenze più recenti sono offerte da uno studio basato su dati ISTAT del 2001, secondo cui l'MCI rappresenterebbe il 10% della mortalità totale, mentre elaborazioni CUSAS su dati ISTAT 2006 e Ministero della Salute portano questa percentuale al 10,84%.⁷

L'incidenza di MCI è più alta nell'uomo (76 per 100.000) che nella donna (45 per 100.000) ed aumenta con l'età. Le donne sono relativamente protette dalla MCI fino all'età della menopausa quando l'incidenza aumenta e si avvicina progressivamente a quella degli uomini⁸.

Il rischio annuo di MCI nella popolazione generale di 35 anni e oltre, è dello 0,1-0,2%, con un'ampia variabilità di sottogruppi di rischio in base al numero e al peso dei fattori di rischio individuali. Il rischio età-correlato per MCI aumenta intorno ai 35 anni. In pazienti con più di 60 anni e con malattie strutturali cardiache avanzate e segni di altro rischio per arresto cardiaco, il tasso di eventi supera il 25% anno.

⁷ Vecchio, M. D. & Padeletti, L. La morte cardiaca improvvisa in Italia. Dimensioni, percezioni, politiche ed impatto economico-finanziario. **9**, 19 (2008).

⁸ Kuriachan, V. P., Sumner, G. L. & Mitchell, L. B. Sudden Cardiac Death. *Current Problems in Cardiology* **40**, 133-200 (2015). Op cit

In merito alla MCI giovanile, le stime negli studi sull'incidenza di morte cardiaca improvvisa variano ampiamente a causa delle differenze nella fascia di età delle varie popolazioni di studio oltre ai criteri per la definizione della morte improvvisa⁹; inoltre, gli studi sono spesso limitati da piccole dimensioni del campione e da progetti di studi retrospettivi e non basati sulla popolazione. Uno studio retrospettivo a livello nazionale sulla morte cardiaca improvvisa in una popolazione non selezionata di persone di età compresa tra 1 e 35 anni in Danimarca ha mostrato un'incidenza di 2,8 per 100.000 persone-anno, o 1,9 per 100.000 persone / anni quando sono stati considerati solo casi autopsia.¹⁰ L'incidenza dell'1,8 per 100.000 all'anno è stata rilevata dopo una revisione dei certificati di morte in Inghilterra e Galles¹¹. L'incidenza di MCI nei bambini e nei giovani adulti varia anche in base all'età e al sesso. All'età di uno o quattro anni, i bambini hanno un'incidenza più alta di MCI rispetto a quelli di età compresa tra 5 e 10 anni che rappresentano la fascia di età a minor rischio. Dopo i 15 anni l'incidenza della MCI inizia ad aumentare progressivamente, con range di età compresa tra 31 e 35 anni in cui vi è un'incidenza fino a 10 volte maggiore rispetto all'età compresa tra 1–10 anni¹². Studi epidemiologici hanno anche costantemente dimostrato che la MCI è significativamente più diffusa tra i maschi rispetto alle femmine, di un fattore di circa 2: 1.^{13,14}

Secondo uno studio eseguito dalla società svizzera di cardiologia¹⁵, la presunta incidenza di MCI nei giovani (di età compresa tra 5 e 39 anni) è di 1,71 / 100.000 persone-anno (2,73 per gli uomini e 0,69 per le donne). Tuttavia, potrebbe essere più elevata poiché non tutti i possibili casi di MCI (annegamento, incidenti stradali, ecc.) sono inclusi.

Dalle diverse casistiche emerge un'incidenza variabile da 1.3 a 8.5/100.000/anno, significativamente maggiore nei maschi. La morte cardiaca improvvisa è responsabile del 19% delle morti improvvise nei bambini tra 1 e 13 anni e del 30% delle morti improvvise nei giovani tra 14 e 21 anni.

⁹ A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults, R.D. Bagnall, R. G. Weintraub, J. Ingle et al. June 23, 2016 N Engl J Med 2016; 374:2441-2452 DOI: 10.1056/NEJMoa1510687

¹⁰ Winkel BG, Holst AG, Theilade J, et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. Eur Heart J 2011; 32:983-990

¹¹ Papadakis M, Sharma S, Cox S, Sheppard MN, Panoulas VF, Behr ER. The magnitude of sudden cardiac death in the young: a death certificate-based review in England and Wales. Europace 2009; 11:1353-1358

¹² Chugh SS, Jui J, Gunson K, et al. Current burden of sudden cardiac death: multiple source surveillance versus retrospective death certificate-based review in a large U.S. community. J Am Coll Cardiol. 2004; 44:1268–75.

¹³ Bagnall RD, Weintraub RG, Ingles J, et al. A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults. New Engl J Med.

¹⁴ Winkel BG, Holst AG, Theilade J, et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1–35 years. Eur Heart J. 2011; 32:983–990.

¹⁵ M. Wilhelma S. a Bolligerb, C. Bartschb Sudden cardiac death in forensic medicine – Swiss recommendations for a multidisciplinary approach, Swiss Med Wkly. 2015;145: w14129

1.2 Substrati morfologici e fattori di rischio

La malattia coronarica con una prevalenza dell'80%, rappresenta la causa più frequente tra i pazienti con più di 35 anni¹⁶. Cause meno frequenti (10- 15%) sono rappresentate da miocarditi, malattie infiltrative, ipertrofia ventricolare sinistra, valvulopatie (in particolare stenosi aortica e prolasso valvolare mitralico).

Malattie rare, come le sindromi aritmiche genetiche, sono presenti nella popolazione con più di 35 anni rispetto alla popolazione più giovane, ma hanno comunque un ruolo minoritario. Tra gli adolescenti e i giovani adulti l'andamento è diverso, con miocarditi, malattie strutturali ereditarie e sindromi aritmiche, che giocano un ruolo importante. Nell'età compresa tra i 25 e i 35 anni c'è una transizione di cause, con un aumento di probabilità di CAD e cardiomiopia dilatativa, in confronto alle altre sindromi menzionate per i gruppi più giovani.⁸

Nei giovani, i disordini elettrici primari ereditari possono determinare più del 30% delle MCI nei giovani, e comprendono principalmente la sindrome del QT lungo (LQTS), la sindrome del QT corto (SQTS), la sindrome di Brugada (BrS) e la tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT).

In uno studio effettuato tra il 2001 e 2005 su 100 casi consecutivi di morti improvvise giovanili (fino a 40 anni) nella Regione Lazio¹⁷, l'autopsia ha consentito di identificare nel 30% dei casi una malattia coronarica (per la maggior parte di natura aterosclerotica) e nel 22% dei casi una cardiomiopia. Risultati simili a quelli della casistica della Regione Veneto^{18,19}. Tra le cardiomiopatie, la più frequente è risultata la cardiomiopia aritmogena del ventricolo destro (ARVC, 12%) seguita dalla cardiomiopia ipertrofica (HCM, 4%). La miocardite è stata riscontrata nel 2% dei casi e il prolasso della valvola mitrale nel 3%, percentuali, queste, che si discostano maggiormente da quelle della Regione Veneto (rispettivamente, 10% e 11%). Infine, nel 20% dei casi il cuore è risultato strutturalmente normale all'autopsia.

¹⁶ Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. *Sudden death due to cardiac arrhythmias*. N Engl J Med 2001; 345: 1473-82.

¹⁷ Gioia CR, Autore C, Romeo DM, et al. Sudden cardiac death in younger adults: autopsy diagnosis as a tool for preventive medicine. Hum Pathol 2006; 37: 794-801. L'importanza dell'indagine autoptica nello studio della morte improvvisa giovanile. L'esperienza nella Regione Lazio

¹⁸ Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. Cardiovasc Res 2001; 50: 399-408

¹⁹ Basso C, Calabrese F, Corrado D, Thiene G. Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. Cardiovasc Res 2001; 50: 290-300.

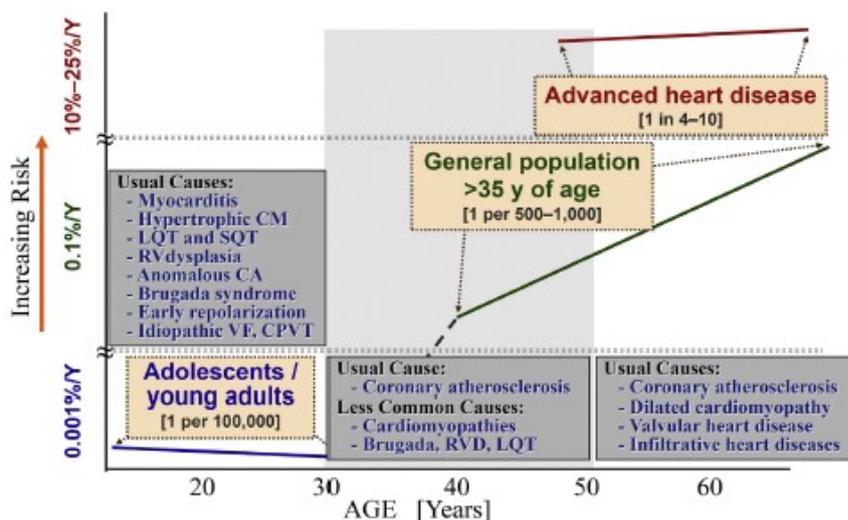


Fig. 1: Rischio età-specifico e malattia-specifico per MCI. Da Sudden Cardiac Death: Interface between Pathophysiology and Epidemiology: *Cardiac Electrophysiology Clinics*. Myerburg, R. J., 2017.

I fattori di rischio per la MCI sono assimilabili a quelli della cardiopatia ischemica e comprendono fumo, ipertensione, dislipidemia e diabete; tali dati si evincono dallo studio di popolazione Framingham²⁰. Il rischio di MCI è aumentato di circa 17 volte durante l'esecuzione di attività fisica intensa, specialmente in coloro che sono generalmente sedentari (circa di 74 volte). Comunque, il rischio assoluto di MCI durante un singolo episodio di esercizio fisico intenso è molto basso (1 ogni 1.51 milioni di casi di esercizio fisico)²¹. Inoltre, una regolare esecuzione di attività fisica, riduce il rischio globale di MCI sia a riposo che durante esercizio. Altri fattori che aumentano il rischio sono fattori stressanti psicosociali, l'uso eccessivo di alcol e il binge drinking, mentre un consumo moderato di alcol potrebbe ridurre il rischio. Il consumo di caffeina non si è dimostrato essere un fattore di rischio per la MCI. Invece, alti livelli di acidi grassi polinsaturi a lunga catena ω -3, sembrano essere un fattore protettivo.

Nella tabella sottostante si rimandano alle principali cause di MCI.

La **tabella 1** mostra l'ampio spettro di patologie che possono esitare in MCI.¹¹

Tabella 1 – Cause di Morte Cardiaca Improvvisa

²⁰ Zipes, D. P. *et al.* ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): *Developed in Collaboration With the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. Circulation* **114**, (2006).

²¹ Albert, C. M. Triggering of Sudden Death from Cardiac Causes by Vigorous Exertion. *The New England Journal of Medicine* **7** (2000).

Coronary causes	Ischemia secondary to coronary atherosclerotic heart disease Coronary vasospasm Congenital anomalous coronary Coronary vasculitis Non-atherosclerotic coronary thrombosis (e.g., anti-phospholipid syndrome)
Cardiomyopathies	Ischemic cardiomyopathy Non-ischemic cardiomyopathy Valvular cardiomyopathy Hypertrophic cardiomyopathy Myocarditis Infiltrative cardiomyopathy Cardiac sarcoidosis Cardiac amyloidosis Hemochromatosis Takotsubo cardiomyopathy Congenital heart disease Left ventricular non-compaction Neuromuscular disease with cardiac manifestation (e.g., myotonic dystrophy and DMD-associated cardiomyopathy)
Hereditary arrhythmogenic cardiomyopathies	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) Phospholamban cardiomyopathy LaminA/Ccardiomyopathy Danon disease
Primary electrical disorders	Long-QT syndrome Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) Brugada syndrome Early repolarization syndrome Idiopathic ventricular fibrillation Short-QT syndrome Wolff–Parkinson–White syndrome Hereditary progressive conduction disease
Metabolic causes	Hyperkalemia/hypokalemia Hypomagnesemia Hypocalcemia Severe hypoglycemia Severe acidosis Hypothermia
Drugs/medication overdose	Cocaine Amphetamines/ecstasy Opiates Tricyclic antidepressants SSRIs Neuroleptics Antiarrhythmic medication Digoxin
Other causes	Cardiac trauma/commotion cordis Pulmonary embolism
DMD=Duchenne muscular dystrophy; SSRIs=selective serotonin reuptake inhibitors.	

1.3 Cause strutturali cardiache

Cardiopatìa ischemica e CAD

La malattia coronarica acuta con la cardiopatìa ischemica associata è la principale causa di MCI. La cicatrice miocardica può essere un substrato anatomico che dà inizio a tachicardia ventricolare (VT) che può degenerare in fibrillazione ventricolare (VF) ed infine in asistolia o in attività elettrica senza polso.²²

Dal punto di vista patologico, la CAD è definita da un cuore che mostra una o più delle tre arterie coronarie ristrette di almeno il 75% da una placca aterosclerotica e/o da trombosi.² La CAD non aterosclerotica associata a MCI invece, è vista meno frequentemente e può essere la manifestazione di un'origine anomala della coronaria sinistra, embolia, arteriti, e dissezione coronarica²³.

L'estensione della malattia vascolare sembra avere un maggior valore predittivo in merito al rischio di MCI rispetto alla localizzazione di specifiche lesioni delle arterie coronarie. Si ritiene che eventi coronarici acuti con recenti trombi, fissurazioni di placca ed emorragie contribuiscano in modo significativo alla MCI, sebbene ci sia stata una bassa incidenza di IMA nelle autopsie di pazienti con MCI²⁴.

Cardiomiopatia non ischemica

La cardiomiopatia non ischemica (NICM) comprende un gruppo di diverse condizioni cardiache che rappresentano disordini sia genetici che acquisiti.¹⁴ È definita come una condizione in cui il muscolo cardiaco è strutturalmente e/o funzionalmente anormale senza che tale alterazione possa essere spiegata da una concomitante coronaropatia, valvulopatia, cardiopatìa congenita o ipertensione arteriosa. Le cardiomiopatie sono classificate a seconda del loro fenotipo morfologico e funzionale in quattro tipi: 1) cardiomiopatia ipertrofica; 2) cardiomiopatia dilatativa; 3) cardiomiopatia restrittiva; 4) cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro²⁵. Circa il 35% è di origine familiare, mentre le forme acquisite sono secondarie ad infezioni, tossici, disordini autoimmunitari, neuromuscolari o nutrizionali. In più

²² Kuriachan, V. P., Sumner, G. L. & Mitchell, L. B. Sudden Cardiac Death. *Current Problems in Cardiology* **40**, 133–200 (2015).

²³ Oliva, A. *et al.* State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death: *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* **32**, 1–16 (2011)

²⁴ Oliva, A. *et al.* State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death: *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* **32**, 1–16 (2011)

²⁵ Branzi, A. & Picchio, F. M. *Core curriculum. Cardiologia*. (McGraw-Hill Education, 2013).

del 50% dei casi si tratta di forme idiopatiche. In generale i pazienti con NICM sono più giovani e hanno una prognosi migliore rispetto ai pazienti con cardiopatia ischemica. Tuttavia, le cardiomiopatie non ischemiche sono la seconda causa di disfunzione sistolica del ventricolo sinistro ed hanno un tasso di mortalità del 12-20% a 3 anni²⁶.

La **Cardiomiopatia Iperτροφica** (HCM) è una malattia genetica autosomica dominante con una penetranza variabile e una prevalenza di circa 1 su 500 nella popolazione generale²⁷. È la causa più comune di morte improvvisa giovanile negli Stati Uniti, in particolare nei giovani atleti competitivi²⁸.

L'HCM è caratterizzata a livello fenotipico da quattro caratteristiche peculiari: l'ipertrofia miocardica, il disarray miocellulare, la patologia delle arteriole coronariche e la fibrosi miocardica²⁹. L'ipertrofia può svilupparsi in qualsiasi punto della massa ventricolare, ma si trova più spesso nel setto interventricolare; nei casi più tipici il fenomeno può essere particolarmente spiccato, talora con aspetti addirittura "estremi" tali da ridurre in maniera altrettanto estrema il volume della cavità ventricolare sinistra rendendola una cavità "virtuale". Il peso del cuore è di solito aumentato ma può anche essere normale o solo leggermente aumentato, come è stato osservato in alcuni casi con mutazioni a carico della troponina T. Le caratteristiche fenotipiche tipiche dell'HCM rappresentano i rilievi istologici più caratteristici di tale patologia.

La **Cardiomiopatia dilatativa** (DCM) è una cardiopatia caratterizzata da dilatazione e disfunzione sistolica del ventricolo sinistro (in alcuni casi anche del ventricolo destro), in assenza di altre condizioni di abnorme sovraccarico emodinamico (e.g. ipertensione arteriosa o valvulopatie) o di coronaropatie in grado di giustificare la dilatazione-ipocinesia ventricolare.³⁰ È una delle più comuni cardiomiopatie con un'incidenza pari ad 1 su 400 negli Stati Uniti. In questa condizione patologica la morte è in genere il risultato di uno scompenso cardiaco o di un'aritmia ventricolare che si manifesta come MCI. La DCM rappresenta infatti una

²⁶ Betensky, B. P. & Dixit, S. Sudden cardiac death in patients with nonischemic cardiomyopathy. *Indian Heart Journal* **66**, S35–S45 (2014).

²⁷ Maron, B. J. & Maron, M. S. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet* **381**, 242–255 (2013).

²⁸ Basso, C. *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy and sudden death in the young: pathologic evidence of myocardial ischemia. *Hum. Pathol.* **31**, 988–998 (2000).

²⁹ Branzi, A. & Picchio, F. M. *Core curriculum. Cardiologia*. (McGraw-Hill Education, 2013).

³⁰ Branzi, A. & Picchio, F. M. *Core curriculum. Cardiologia*. (McGraw-Hill Education, 2013).

percentuale significativa delle MCI, soprattutto tra i soggetti in età lavorativa, con un'incidenza annuale del 2-3%³¹.

Le cause della DCM sono altamente eterogenee e complesse, e includono condizioni genetiche e acquisite.

La **Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC)** è un disturbo muscolare cardiaco geneticamente determinato, caratterizzato da sostituzione fibroadiposa del miocardio ventricolare³². L'ARVC può causare insufficienza cardiaca, VT/VF e MCI³³ inoltre la morte improvvisa può essere la prima manifestazione clinica della malattia. La mortalità totale stimata varia a seconda degli studi dallo 0,08% al 3,6% annuo- Alcune evidenze mostrano come l'esercizio fisico sia dannoso nell'ARVC, poiché causa un aumento del rischio di aritmie sia in acuto che in cronico, e una progressione sintomatica della disfunzione del VD, nonché un aumento delle morti improvvise durante l'esercizio³⁴. È possibile, infatti, che la debolezza strutturale causata dalle mutazioni delle proteine desmosomiali si traduca in un danno cellulare "innescato" dallo sforzo fisico, e che questo, a sua volta, inneschi processi infiammatori e, successivamente, riparativi fibroadiposi e fibrosi.

I disturbi di accoppiamento possono portare alla morte dei miociti e a modificazioni fibroadipose, creando un substrato per le aritmie.³⁵

Miocarditi

La miocardite è definita come un processo patologico a carico del miocardio che può essere attribuita a molte cause, comprese forme infettive, tossiche e idiopatiche³⁶. Le manifestazioni cliniche variano da forme subcliniche a MCI, con aritmie atriali o ventricolari di nuova insorgenza, blocco cardiaco completo, o una sindrome simil-infarto miocardico acuto.

³¹ Halliday, B. P., Cleland, J. G. F., Goldberger, J. J. & Prasad, S. K. Personalizing Risk Stratification for Sudden Death in Dilated Cardiomyopathy: The Past, Present, and Future. *Circulation* **136**, 215–231 (2017).

³² Betensky, B. P. & Dixit, S. Sudden cardiac death in patients with nonischemic cardiomyopathy. *Indian Heart Journal* **66**, S35–S45 (2014).

³³ Saguner, A. M., Brunckhorst, C. & Duru, F. Arrhythmogenic ventricular cardiomyopathy: A paradigm shift from right to biventricular disease. *World Journal of Cardiology* **6**, 154–174 (2014).

³⁴ Atteya, G. & Lampert, R. Sudden Cardiac Death in Genetic Cardiomyopathies. *Cardiac Electrophysiology Clinics* **9**, 581–603 (2017).

³⁵ Saguner, A. M., Brunckhorst, C. & Duru, F. Arrhythmogenic ventricular cardiomyopathy: A paradigm shift from right to biventricular disease. *World Journal of Cardiology* **6**, 154–174 (2014).

³⁶ Oliva, A. *et al.* State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death: *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* **32**, 1–16 (2011).

Nelle forme più severe, le miocarditi acute possono presentarsi con scompenso cardiaco congestizio, disfunzione del ventricolo sinistro e shock cardiogeno³⁷.

Valvulopatie

Le valvulopatie sono causa di circa il 2% delle MCI nei soggetti adulti.²⁸ I pazienti affetti sono a rischio sia di bradiaritmia che di tachiaritmia, ed entrambe possono condurre a MCI. Il meccanismo alla base della MCI in pazienti affetti da valvulopatia è simile a quello esistente nelle altre patologie cardiache. Le aritmie si sviluppano da effetti secondari della valvulopatia sul miocardio, come la dilatazione delle camere, l'ipertrofia, la disfunzione sistolica e gli esiti cicatriziali³⁸.

Anomalie congenite delle arterie coronarie

Le anomalie delle arterie coronarie sono un fenomeno poco comune, con una prevalenza approssimativa tra lo 0,2 e l'8,4%, ma potenzialmente letale, in quanto rappresentano un fattore di rischio per l'MCI, specialmente nei giovani³⁹. La MCI in questi soggetti è associata essenzialmente a fattori anatomici: chiusura da parte di un lembo di una deformazione simile ad una fessura dell'ostio coronarico; angolo acuto, e non ortogonale, con un'origine alta e un attorcigliamento della coronaria quando emerge dall'aorta; ipoplasia e/o stenosi di un segmento intramurale, in particolare a livello della commessura valvolare. Inoltre, il sommarsi di episodi ischemici può portare a necrosi e fibrosi miocardica responsabile di aritmie ventricolari⁴⁰

Malattie cardiache non strutturali geneticamente determinate:

³⁷ De Salvia, A., De Leo, D., Carturan, E. & Basso, C. Sudden cardiac death, borderline myocarditis and molecular diagnosis: evidence or assumption? *Med Sci Law* **51 Suppl 1**, S27-29 (2011).

³⁸ Zipes, D. P. *et al.* ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): *Developed in Collaboration With the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. Circulation* **114**, (2006).

³⁹ Feldman, A. M. & McNamara, D. Myocarditis. *New England Journal of Medicine* **343**, 1388–1398 (2000).

⁴⁰ Yuan, S.-M. Anomalous origin of coronary artery: taxonomy and clinical implication. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* (2014). doi:10.5935/1678-9741.20140109

Disordini elettrici primari

Le malattie cardiache non strutturali geneticamente determinate si presentano con un'alterazione dell'ECG di base o sotto sforzo e hanno un alto rischio di MI⁴¹. L'instabilità elettrica è dovuta ad un'alterazione dei canali ionici di membrana cellulare o del reticolo sarcoplasmatico, identificabile solo con uno screening genetico.

I disordini elettrici primari ereditari possono determinare più del 30% delle MCI nei giovani, e comprendono principalmente la sindrome del QT lungo (LQTS), la sindrome del QT corto (SQTS), la sindrome di Brugada (BrS) e la tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT).

Queste patologie, anche conosciute come “channelopatie” cardiache, più spesso sono dovute a mutazioni in geni che codificano per canali ionici cardiaci, recettori e/o proteine regolatrici; la conseguenza di ciò, in tutti i casi, è una modificazione del potenziale d'azione cardiaco o del calcio intracellulare, che porta ad un'instabilità elettrica e predispone ad aritmie ventricolari pericolose per la vita⁴². più recentemente una patologia definita “sindrome da ripolarizzazione precoce” è emersa come nuova potenziale canalopatia; sebbene sia caratterizzata da un profilo ECG che sembra essere più comune tra i soggetti colpiti da MCI, molte delle potenziali varianti genetiche associate con la malattia sono carenti di validazioni funzionali e biologiche.

La Sindrome del QT lungo (LQTS) è una malattia ereditaria caratterizzata da un'alterazione dell'ECG di base e consiste in un prolungato intervallo di QT che riflette l'anormale ripolarizzazione dei miociti cardiaci. Rappresenta una fra le principali cause di morte improvvisa con autopsia negativa nei giovani⁴³. Le sincope, tipiche manifestazioni della LQTS, spesso sono dovute a stress fisico o emozionale. I 3 geni principali, KCNQ1 (QTL1, QT lungo di tipo 1), KCNH2 (QTL2, QT lungo di tipo 2), e SCN5A (QTL3, QT lungo di tipo 3), spiegano all'incirca il 75% dei casi clinicamente definiti di SQTL, mentre i geni minori contribuiscono tutti insieme a un ulteriore 5%. All'incirca il 20% dei casi di SQTL non trova al momento una caratterizzazione genetica⁴⁴. La Sindrome del QT corto: si presenta all'ECG di

⁴¹ Thiene G, Corrado D, Basso C. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004; 25: 1772-5.

⁴² Garcia-Elias, A. & Benito, B. Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 692 (2018).

⁴³ Tester D.J., Ackerman M.J.; Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:240-246.

⁴⁴ Peter J. Schwartz, Michael J. Ackerman, Alfred L. George, Arthur A.M. Wilde *J Am Coll Cardiol* 2013;62:169-180

base con un accorciamento dell'intervallo di QT dovuto all'eccessiva velocità di ripolarizzazione dei miociti. È caratterizzata da un'alta incidenza di sincope e di MI.

La Sindrome di Brugada è una malattia caratterizzata da alterazioni dell'ECG (sopraslivellamento non ischemico del tratto ST nelle precordiali V1-V3 e blocco di branca destra). Sincope, tachicardia ventricolare, arresto cardiaco nel sonno sono spesso la prima presentazione di questa patologia. Il paziente-tipo è un uomo intorno ai 40 anni rianimato senza una chiara evidenza di cardiopatia organica e con una storia familiare di morte cardiaca improvvisa (notturna). Infatti, fino al 75% dei soggetti clinicamente affetti sono di sesso maschile e hanno intorno ai 40 anni al momento dell'insorgenza dell'evento clinico (si tratta dell'età media, con un range tuttavia piuttosto ampio). Nel 20-50% dei casi si ha una storia familiare di morte cardiaca improvvisa.

La Sindrome delle tachicardie ventricolari polimorfe catecolaminergiche (CPVT-1): è caratterizzata da aritmie che avvengono durante sforzo fisico o stress emotivo, riproducibili durante il test da sforzo, ma non presenti all'ECG di base che appare normale. La sincope e la MI sono spesso la prima manifestazione. Similmente a QTL1, la TVPC è caratterizzata fenotipicamente da sincope, convulsioni o morte improvvisa indotte dall'esercizio fisico in assenza di una cardiopatia organica. Tuttavia, a differenza della SQTL, l'ECG a riposo è tipicamente normale, solo con una bradicardia lieve e non diagnostica e la presenza occasionale di onde U. Il test ergometrico al tapis roulant o al cicloergometro o uno stress farmacologico con isoproterenolo consentono di porre diagnosi di TVPC, in quanto svelano la caratteristica tachicardia ventricolare bidirezionale indotta dall'esercizio. Similmente a QTL1, la TVPC è caratterizzata fenotipicamente da sincope, convulsioni o morte improvvisa indotte dall'esercizio fisico in assenza di una cardiopatia organica. Tuttavia, a differenza della SQTL, l'ECG a riposo è tipicamente normale, solo con una bradicardia lieve e non diagnostica e la presenza occasionale di onde U. Il test ergometrico al tapis roulant o al cicloergometro o uno stress farmacologico con isoproterenolo consentono di porre diagnosi di TVPC, in quanto svelano la caratteristica tachicardia ventricolare bidirezionale indotta dall'esercizio.

Nelle sindromi aritmiche ereditarie i fattori scatenanti l'evento aritmico possono essere gene-specifici, anche se non in senso assoluto: nella LQTS 1, le aritmie sono prevalentemente indotte dall'esercizio fisico; nella LQTS 3 e nella BS, la morte improvvisa avviene più spesso nel sonno; nella LQTS 2 gli stimoli uditivi e gli stress emotivi sono eventi scatenanti abbastanza comuni.

2 Capitolo

2.1 Morte cardiaca improvvisa giovanile: diagnosi autoptica come strumento di medicina preventiva

Sebbene la morte cardiaca improvvisa sia una delle modalità di morte più importanti nell'Unione Europea, patologi e medici di sanità pubblica non hanno dato a questo problema l'attenzione che merita.

Anche se relativamente meno numerosa in termini numerici, la MCI di individui giovani è caratterizzata dalla natura improvvisa e inaspettata dell'evento, essendo le vittime individui apparentemente in forma e in salute senza storia di sintomi e malattia, la morte ha quindi un impatto devastante sia sui membri della famiglia sopravvissuti, sia sulla comunità⁴⁵.

A causa della modalità del decesso, le MCI si verificano più frequentemente fuori dall'ospedale, in contesti di comunità, o al domicilio e spesso si tratta di decessi “non testimoniati”, pertanto, le autopsie sono quasi invariabilmente eseguite da patologi forensi, che si attengono alle richieste e indicazioni dei tribunali competenti. Nei casi in cui, al contrario, è stato possibile rianimare il paziente dopo l'arresto cardiaco e ricoverarlo in un ospedale pubblico, è l'anatomo patologo a eseguire il riscontro diagnostico richiesto dai medici curanti per definire la causa della morte.

L'identificazione della causa di una morte improvvisa fornisce alla famiglia una comprensione parziale e l'iniziale razionalizzazione dell'evento luttuoso inaspettata, e permette di comprendere se il rischio di morte improvvisa può estendersi ai familiari. Di conseguenza, sembra ragionevole che tutte le vittime di morte improvvisa inspiegabile siano sottoposte a perizia post-mortem per indagare un'eventuale origine cardiaca primitiva.

Tuttavia, nonostante le raccomandazioni delle società scientifiche, nei casi di MCI, l'esame autoptico, sia esso clinico o forense, non è sempre eseguito con ovvie ripercussioni sulla identificazione della esatta incidenza del fenomeno e sulle cause di morte.

Il modo in cui sono organizzate le indagini post mortem differisce tra paesi. Nei casi di morte improvvisa le autopsie sono di solito condotte in due contesti distinti, l'autopsia “clinica” e l'autopsia definita “forense” o “giudiziaria”. A fini forensi, l'obiettivo è quello di indagare il potenziale coinvolgimento di terzi (ad es. omicidio o incidente) o morte in conseguenza di reati,

⁴⁵ Semsarian, C., Ingles, J. & Wilde, A. A. M. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European Heart Journal* **36**, 1290–1296 (2015).

mentre per il contesto clinico il fine è identificare la causa patologica alla base della morte cardiaca improvvisa.

L'autopsia *clinica, il c.d. riscontro diagnostico*, è svolta su richiesta del medico per motivi clinici, cioè identificare la causa della morte. In caso di morte improvvisa, l'obiettivo dell'autopsia clinica è primariamente quello di determinare se la morte sia dovuta a patologie cardiache o ad una delle altre possibili cause non cardiache. A completamento del riscontro diagnostico è eseguito l'accertamento istopatologico. Di routine, non vengono eseguite altre indagini come quelle tossicologiche, microbiologiche e campioni per la genetica.

Differente è il fine con cui viene eseguita l'autopsia *giudiziaria* nei casi di morte inaspettata, inspiegata o di presunta morte non naturale. È richiesta dall'Autorità Giudiziaria e oltre all'identificazione della causa e dei mezzi del decesso ha come fine oltre l'identificazione della causa della morte, anche l'esclusione di ipotesi di reato.

Nello specifico contesto della MCI, il ruolo dell'autopsia, sia essa clinica o giudiziaria, è quello di stabilire o considerare:

- Se la morte sia attribuibile a patologie cardiache o ad altre cause di morte improvvisa;
- La natura della malattia cardiaca e se il meccanismo sia aritmico o meccanico;
- Se le condizioni che hanno causato la morte improvvisa possano essere ereditarie, richiedendo quindi screening e counselling ai parenti più prossimi;
- La possibilità di assunzione di sostanze tossiche, abuso di droghe, traumi, e altre cause innaturali di morte;
- Il ruolo di terzi nel decesso⁴⁶.

2.2 Decremento del numero di autopsie. Problematica emergente

Le autopsie nel contesto delle MCI hanno quindi importanti implicazioni giuridiche, etiche, mediche e di salute pubblica⁴⁷ in quanto identificare la causa di morte è fondamentale per migliorare strategie preventive e terapeutiche.

⁴⁶ on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Archiv* 471, 691–705 (2017).

⁴⁷ Hudzik, B., Hudzik, M., Lekston, A. & Gasiór, M. Sudden unexplained cardiac deaths in young adults: a call for multidisciplinary approach. *Acta Cardiologica* 73, 7–12 (2018).

L'autopsia (dal greco αὐτός “stesso” e ὄψις “vista”, letteralmente “che vede con i propri occhi”) è una pratica di primaria importanza per la conoscenza e lo studio delle malattie. Le finalità e i valori che le sono stati attribuiti nella formazione accademica, nella pratica medica e nella ricerca scientifica risalgono a oltre tre secoli fa e sono perdurati, sostanzialmente immutati, fino alla prima metà del ventesimo secolo. Come riportato da Onetti Muda⁴⁸, tali finalità e valori spaziano dall'accertamento della causa di morte, alla compilazione delle statistiche di mortalità, alla verifica di percorsi diagnostico-terapeutici e alla valutazione della performance qualitativa di équipe mediche e strutture sanitarie

Tuttavia, è iniziata nella seconda metà del secolo scorso, ed è attualmente in corso, una progressiva riduzione del numero di riscontri autoptici eseguiti presso i policlinici universitari e, più in generale, le strutture ospedaliere.

Secondo alcuni Autori^{49,50} la causa della riduzione delle autopsie è sicuramente multifattoriale, tra questi vanno segnalati risorse economiche limitate, mancata richiesta da parte dei clinici per timore di veder valutato il proprio operato, convinzione che il progresso della tecnologia medica abbia reso obsoleta tale pratica, carenza di personale di supporto qualificato, oltre considerare l'autopsia come del tutto inutile nell'era delle tecniche avanzate nonché di biologia molecolare, fino anche a una formazione non adeguato durante la specializzazione.

Se il dato relativo alla riduzione del tasso di autopsie è concorde^{51,52} vi è una notevole differenza tra i paesi e le regioni nel numero di autopsie condotte e per molti paesi mancano i dati⁵³. Uno studio olandese⁵⁴, riporta che in circa il 43% dei decessi avvenuti improvvisamente

⁴⁸ Onetti Muda A. Autopsia e formazione medica; MEDIC 2013; 21(1): 97-100100,

⁴⁹ Blokker BM, Weustink AC, Hunink MGM, Oosterhuis JW. Autopsy rates in the Netherlands: 35 years of decline. PLoS One. 2017 Jun 15;12(6): e0178200. doi: 10.1371/journal.pone.0178200. eCollection 2017. PubMed PMID: 28617835; PubMedCentral PMCID: PMC5472266.

⁵⁰ Turnbull A, et al. J Clin Pathol 2015;68:601–604. doi:10.1136/jclinpath-2014-20270

⁵¹ Rodewald AK, Bode P, Cathomas G, Moch H. [Clinical autopsies in Switzerland: A status report]. Pathologe. 2017 Sep;38(5):416-421. doi:10.1007/s00292-017-0323-8. Review. German. PubMed PMID: 28752179. ABSTRACT

⁵² Royal College of Pathologists of Australasia Autopsy Working Party. The decline of the hospital autopsy: a safety and quality issue for healthcare in Australia. Med J Aust. 2004 Mar 15;180(6):281-5. Review. PubMed PMID: 15012566.

⁵³ Fellmann F, van El CG, Charron P, Michaud K, Howard HC, Boers SN, Clarke AJ, Duguet AM, Forzano F, Kaufenstein S, Kayserili H, Lucassen A, Mendes Á, Patch C, Radojkovic D, Rial-Sebbag E, Sheppard MN, Tassé AM, Temel SG, Sajantila A, Basso C, Wilde AAM, Cornel MC; on behalf of European Society of Human Genetics, European Council of Legal Medicine, European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases, European Reference Network for rare, low prevalence and complex diseases of the heart (ERN GUARD-Heart), Association for European Cardiovascular Pathology. European recommendations integrating genetic testing into multidisciplinary management of sudden cardiac death. Eur J Hum Genet. 2019 Jun 24. doi: 10.1038/s41431-019-0445-y. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31235869.

⁵⁴ Winkel BG, Holst AG, Theilade J, Kristensen IB, Thomsen JL, Ottesen GL, et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. Eur Heart J. 2011; 32:983–90

(MCI) di persone di età compresa tra 1 e 44 anni è stata eseguita un'autopsia, in Danimarca⁵⁵ si è riscontrato che tale percentuale raggiungeva il 70% il 60%. In molti altri paesi, il tasso è sconosciuto.

Il tasso di autopsie varia tra i diversi paesi, se in Inghilterra il 22% dei decessi è seguito da autopsia, questo tasso scende al 12% e al 9% in Scozia e Irlanda del Nord ed è noto che negli ultimi anni si è assistito a un decremento del numero di autopsie con ovvie ripercussioni sulla raccolta di dati per una stima precisa sulle precise cause di morte. Alcuni istituti non eseguono nemmeno un'autopsia nei casi di MCI, sebbene la reale misura in cui ciò avvenga è difficile da valutare.

Per questo, speciale attenzione è rivolta alle indagini medico-legali e all'autopsia e nel 1999, il Comitato dei Ministri del Consiglio europeo ha emanato una raccomandazione sull'armonizzazione delle norme sull'autopsia medicolegale e ha stabilito criteri chiari in quali circostanze è **necessaria** un'autopsia^{56,57,58} inclusa la morte improvvisa e imprevista sottolineando la urgente necessità di istruire i professionisti su questi criteri⁵⁹.

Secondo le “*Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death*,” l'autopsia dovrebbe essere svolta in **tutti** i casi di MCI di giovani adulti, sebbene il limite di età sia ancora soggetto di discussione. Dopo un recente consenso derivante dal seminario intitolato “Aspetti Etici, Legali e Pratici dell'analisi genetica post-mortem della morte cardiaca improvvisa nei giovani adulti”, organizzato dal “Public and Professional Policy Committee of the European Society of Human Genetics”, tenutosi a Ginevra nel Novembre 2016, si raccomanda di svolgere un'autopsia in tutti i casi di soggetti minori di 40 anni, mentre si dovrebbe considerare in vittime tra i 40 e i 65 anni e può essere deciso caso per caso negli individui più vecchi di 65 anni⁶⁰.

⁵⁵ Risgaard B, Winkel BG, Jabbari R, Behr ER, Ingemann-Hansen O, Thomsen JL, et al. Burden of sudden cardiac death in persons aged 1 to 49 years: nationwide study in Denmark. *Circ Arrhythm Electro*. 2014; 7:205–11

⁵⁶ Brinkmann B. Harmonization of medico-legal autopsy rules. Committee of Ministers. Council of Europe. *Int J Leg Med*. 1999; 113:1–14.

⁵⁷ Recommendation no. R (99) 3 of the Committee of Ministers to member states on the harmonization of medico-legal autopsy rules. *Forensic Sci Int*. 2000; 111:5–58.

⁵⁸ Council of Europe. Recommendation No. R (99) 3 of the Committee of Ministers to member States on the harmonisation of medico-legal autopsy rules⁷ (Adopted by the Committee of Ministers on 2 February 1999 at the 658th meeting of the Ministers' Deputies). Texts of the Council of Europe on bioethical matters. Strasbourg, 2014. p. 72–85. https://www.coe.int/t/dg3/European_recommendations_integrating_genetic_testing_into_multidisciplinary_management_of_sudden_death

⁵⁹ Basso C, Aguilera B, Banner J, Cohle C, d'Amati G, Henriques de Gouveia R, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch*. 2017; 471:691–705.

⁶⁰ Argelia, M.-D. *et al.* Recommendations for genetic testing and counselling after sudden cardiac death: practical aspects for Swiss practice. *Swiss Medical Weekly* (2018).

Inoltre, secondo quanto riportato nel consenso pubblicato nel 2011 e nel 2013^{61, 62}. I casi di soggetti minori di 40 anni che sono sopravvissuti o anche che non sono sopravvissuti meno ad un arresto cardiaco improvviso, presentano l'indicazione per l'esecuzione di test genetici.

2.3 Dati anamnestici e circostanziali

In accordo con le linee guida europee per la MCI, sia in caso di autopsia clinica sia in caso di autopsia giudiziaria, le informazioni necessarie da ottenere prima di una autopsia sarebbero:

- Età, genere, lavoro, stile di vita (fumo o alcol), livello di attività fisica;
- Circostanze di morte: epoca, intervallo di tempo trascorso tra comparsa dei sintomi e decesso, luogo, circostanze (a riposo, durante il sonno, durante attività sportiva o stress emotivi), assistita o non assistita, qualsiasi circostanza sospetta (immersione, incidente stradale, intossicazione);
 - Anamnesi patologica remota: stato di salute generale, pregresse patologie significanti, pregressi esami ed interventi chirurgici
 - Terapia farmacologica in atto
 - Anamnesi familiare cardiaca: cardiopatia ischemica, morti improvvise premature, aritmie (anche soggetti deceduti durante sinistri stradali perché non è possibile escludere che sia riconducibile a un evento cardiaco acuto)
 - Tracciati ECG eseguiti durante le manovre di rianimazioni, enzimi sierici e misurazioni di troponine⁶³.

Un problema comune nella pratica forense è che le famiglie dei deceduti spesso comunicano solo con le forze dell'ordine o con il magistrato inquirente. Il medico legale, è autorizzato a parlare alla famiglia solo con il permesso del giudice ma spesso ciò non si verifica e gli approfondimenti degli inquirenti sui casi di MCI non sono in grado di scoprire correttamente fatti pertinenti relativi alla storia medica degli individui in quanto le loro indagini sono basate solo sull'esclusione di ipotesi di reato. Per questo motivo, una anamnesi clinica del

⁶¹ Priori, S. G. *et al.* HRS/EHRA/APHRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm* **10**, 1932–1963 (2013).

⁶² Ackerman, M. J. *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). *EP Europace* **13**, 1077–1109 (2011).

⁶³ on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology *et al.* Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Archiv* **471**, 691–705 (2017).

soggetto e dei suoi familiari, anche se significativa spesso capita che non venga riportata al patologo forense.

Le circostanze della morte, se note, e le informazioni cliniche sono di grande rilevanza per la diagnosi. In questo contesto il patologo forense può ottenere informazioni da quello che è definito “sopralluogo giudiziario” in cui il medico legale, su ordine della procura si reca sul posto in cui è stata rinvenuta la vittima. Il **sopralluogo giudiziario** “è un mezzo di ricerca della prova” previsto e disciplinato dall’articolo 244 e dai seguenti del cpp consiste in un accertamento che può avere ad oggetto persone, luoghi o cose. Esso viene richiesto per accertare le tracce e gli effetti materiali di un reato. In particolare, chi lo dispone è il pubblico ministero che è il titolare delle indagini penali. Il cpp prevede anche “accertamenti urgenti sui luoghi, sulle cose e sulle persone” (art. 354 cpp) quando vi sia rischio di modifica. In caso di “sopralluogo giudiziario” i medici legali si recano la scena in cui è avvenuto il decesso ed esaminare attentamente la vittima escludendo, già sul posto e orientando se si tratta di morte naturale o se vi è un sospetto di reato, visitano lo stato dei luoghi, i vestiti e gli effetti personali della vittima (ivi comprese medicine o presunte sostanze di abuso). Il medico-legale dovrebbe inoltre essere informato di tutti i dettagli relativi alle circostanze di morte del paziente, alla sua storia clinica e ai farmaci prescritti. In pratica però, spesso questi dati non sono disponibili, e molti decessi avvengono in casa e senza assistenza⁶⁴.

Infine, i risultati dell'autopsia hanno come destinatario l’Autorità giudiziaria e non sempre vengono correttamente trasmessi alla famiglia, sarebbe di primaria importanza migliorare il sistema di trasmissione dei risultati dell'autopsia in caso di morte cardiaca improvvisa per aumentare il numero di famiglie che ricevono consulenza genetica e valutazione cardiologica al fine di identificare eventuali portatori asintomatici di malattie cardiache.

2.4 Procedura autoptica

Tutte le autopsie di Morti Improvvise dovrebbero essere condotte mediante una procedura standardizzata, che dovrebbero indirizzare verso specifiche cause cardiache o extra-cardiache di morte improvvisa. Tutti gli aspetti della procedura autoptica dovrebbero aderire alle “Raccomandazioni per l’Armonizzazione delle Regole dell’Autopsia Medico-Legale” prodotte dalla Commissione dei Ministri del Consiglio Europeo nel 1999⁶⁵.

⁶⁴ Oliva, A. et al. State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death: The American Journal of Forensic Medicine and Pathology 32, 1–16 (2011)

⁶⁵ Brinkmann, B. Harmonisation of Medico-Legal Autopsy Rules. *International Journal of Legal Medicine* 113, 1–14 (1999).

L'Associazione Europea di Patologie Cardiovascolari ha realizzato nel 2008 le prime linee guida inerenti il protocollo autoptico da seguire in caso di MCI⁶⁶; questo documento è stato aggiornato nel 2017 (Immagine 1) alla luce delle nuove conoscenze in ambito genetico e delle patologie cardiovascolari, della disponibilità di nuovi metodi diagnostici e dell'esperienza ottenuta dall'uso routinario delle prime linee guida. Questo aggiornamento comprende un protocollo dettagliato per l'esame del cuore e raccomandazioni per la selezione dei blocchi istologici e di materiali appropriati per la tossicologia, la microbiologia, la biochimica e per le indagini molecolari, che rappresenta il minimo standard nella pratica autoptica routinaria per un'indagine adeguata di MCI. Queste linee guida sono indirizzate ai centri medici universitari, agli ospedali regionali e a tutti i professionisti in ambito sanitario che praticano patologia forense, con l'intento di uniformare la procedura in tutti i paesi Europei e di identificare pattern patologici emergenti responsabili di MCI⁶⁷. Il Royal College of Pathologist ha inoltre prodotto linee guida nei casi di autopsia di MCI nel 2015⁶⁸ (Immagine 2) e recentemente revisionate nel 2019 includendo linee guida per l'epilessia.⁶⁹

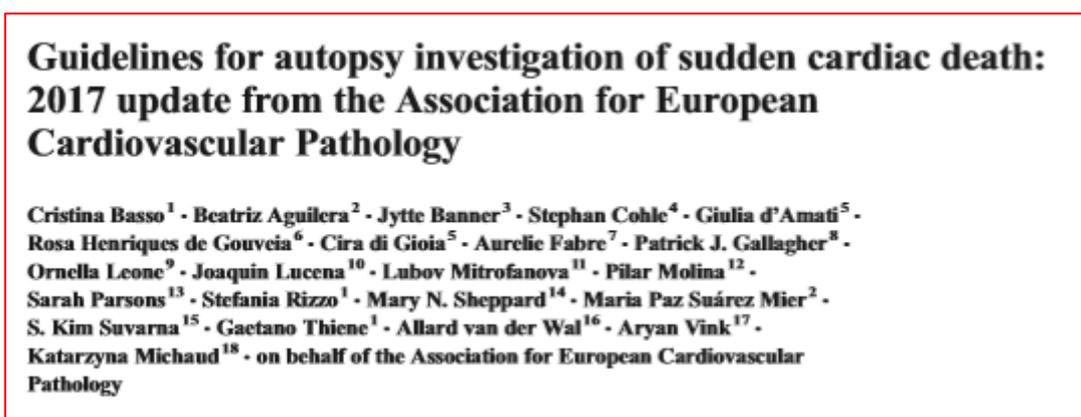


Immagine 1

⁶⁶ Basso, B. C. *et al.* Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv* **452**, 11–18 (2008).

⁶⁷ on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology *et al.* Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Archiv* **471**, 691–705 (2017).

⁶⁸ Guidelines on autopsy practice: Sudden death with likely cardiac pathology July 2015 The Royal College of Pathologists

⁶⁹ Guidelines on autopsy practice: Deaths in patients with epilepsy including sudden deaths July 2019 The Royal College of Pathologists

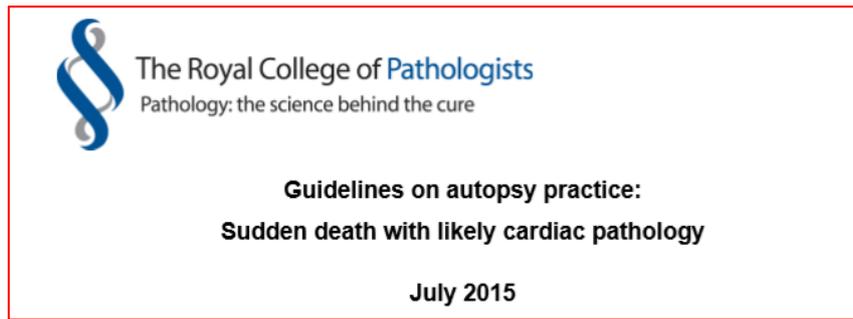


Immagine 2

Esame esterno

In corso di esame esterno si procede all'esame sistematico delle alterazioni osservabili. All'esame esterno è necessario stabilire peso e altezza del corpo per correlarli al peso del cuore e allo spessore di parete che verranno rilevati all'autopsia. È stata inoltre proposta la misurazione della intera circonferenza addominale cadaverica e il calcolo del "waist to height ratio" (rapporto giro vita – altezza), in grado di fornire una valutazione del rischio cardiovascolare del soggetto molto più accurata rispetto al Body Mass Index (BMI)⁷⁰.

Andranno altresì controllati la presenza di accessi venosi di recente inserzione (in caso di sospetta assunzione di sostanze xenobiotiche per via endovenosa), segni di intubazione, elettrodi per l'esame elettrocardiografico, defibrillatori e bruciature elettriche, tubi di drenaggio a andrà valutata mediante presa palpazione presenza di eventuali fratture sottostanti; dato sempre il maggior uso nella pratica clinica, nei casi di MCI sarà inoltre necessario verificare la presenza di defibrillatori impiantabili (ICD) o pacemaker.³In un'autopsia forense, tutte le lesioni esterne ed interne sono studiate e descritte nel dettaglio e di solito vengono fotografate.

Durante l'esame esterno, nei casi di autopsia giudiziaria, va sempre valutata la presenza di lesioni che possano escludere l'azione di terzi nel determinismo del decesso.

Sempre maggior rilievo sta assumendo la radiologia post mortem (TC e/o RM) che a complemento dell'indagine autoptica sono svolte prima che inizi l'esame esterno e la sezione cadaverica.

⁷⁰ Ashwell, M. & Gibson, S. Waist-to-height ratio as an indicator of 'early health risk': simpler and more predictive than using a 'matrix' based on BMI and waist circumference. *BMJ Open* 6, e010159 (2016).

Autopsia completa con approccio sequenziale alla morte improvvisa

Oltre a quella cardiaca, cause frequenti ed infrequenti di morte improvvisa sono: 1) cerebrali (eg, emorragie subaracnoidee o intracerebrali); 2) respiratorie (eg, asma, broncopolmonite, etc.); 3) shock emorragico acuto (eg, rottura di aneurisma aortico, ulcera peptica, etc.); 4) shock settico (sindrome di Waterhouse-Friderichsen). Una volta escluse tali condizioni, è necessario concentrarsi sulla ricerca di cause cardiache di morte improvvisa.

I distretti potenzialmente interessati da condizioni patologiche responsabili del decesso e quindi da valutare attentamente in corso di autopsia sono le coronarie, il miocardio, le valvole cardiache, il sistema di conduzione, l'aorta intrapericardica o l'arteria polmonare⁷¹.

Esame macroscopico standard del cuore

Secondo le linee guida europee di Basso et. Al., anche l'esame macroscopico del cuore necessita di un approccio standardizzato e sequenziale al fine di identificare le possibili cause di MCI. Gli step che devono essere seguiti sono:

1. Controllare il pericardio, aprirlo ed esplorarne la cavità;
2. Controllare l'anatomia delle grandi arterie, aprire l'arteria polmonare in situ per identificare emboli, prima di sezionarle 3 cm sopra le valvole aortiche e polmonari.
3. Se si sospetta una malattia cardiaca congenita, è meglio eseguire una rimozione in blocco di cuore e polmoni tagliando il pericardio dal diaframma e sezionando la vena cava inferiore, l'aorta e l'esofago.
4. Se si sospettasse una dissezione aortica, dovrebbe essere mantenuta la continuità dell'aorta ascendente con l'arco aortico e con l'aorta toracica-addominale discendente fino alla biforcazione delle iliache.
5. Controllare e sezionare le vene polmonari. Sezionare la vena cava superiore 2 cm sopra il punto in cui la cresta dell'appendice dell'atrio destro incontra la vena cava superiore (per preservare il nodo seno-atriale). Sezionare la vena cava inferiore vicino al diaframma.
6. Aprire l'atrio destro dalla vena cava inferiore all'apice dell'appendice. Aprire l'atrio sinistro tra le vene polmonari superiori e poi a livello dell'appendice atriale. Ispezionare le cavità atriali e il setto inter-atriale e definire la pervietà del forame ovale. Esaminare le valvole mitralica e tricuspide (o valvole protesiche) da sopra e controllare l'integrità dei muscoli papillari e delle corde tendinee.

⁷¹ Ashwell, M. & Gibson, S. Waist-to-height ratio as an indicator of 'early health risk': simpler and more predictive than using a 'matrix' based on BMI and waist circumference. *BMJ Open* 6, e010159 (2016).

7. Ispezionare l'aorta, l'arteria polmonare, le valvole aortica e polmonare (o valvole proteiche) da sopra.

8. Controllare le arterie coronarie:

a. Esaminare dimensioni, forma, posizione, numero e pervietà dell'ostio coronarico;

b. Valutare dimensioni, decorso e "dominanza" delle maggiori arterie epicardiche;

c. Fare tagli multipli trasversali ad intervalli di 3 mm lungo il decorso delle principali arterie epicardiche, includendo diramazioni come ad esempio il margine diagonale e ottuso, e controllarne la pervietà;

d. Le arterie coronarie molto calcificate dovrebbero essere rimosse intatte, decalcificate e aperte trasversalmente; talvolta possono essere esaminate in situ con sezioni trasversali fatte con forbici affilate;

e. I segmenti delle arterie coronarie contenenti sten metallici dovrebbero essere spediti intatti ai laboratori per facilitare l'inclusione in resina.

f. I bypass coronarici (vene safene, arterie mammarie interne, arterie radiali) dovrebbero essere esaminate attentamente con tagli trasversali. Le anastomosi prossimali e distali dovrebbero essere studiate con particolare attenzione.

9. Fare un taglio trasversale completo del cuore (sull'asse corto) a livello di metà ventricolo e poi più distanti, fare delle fette trasverse parallele dei ventricoli ad 1 cm di intervallo di distanza dall'apice. Valutare queste sezioni con attenzione, ricercando cambiamenti nella superficie di taglio del miocardio e dell'endocardio delle cavità ventricolari. Si raccomanda fortemente di non dissezionare il miocardio con sezioni parallele alle superfici endo-epicardiche

10. La colorazione di Trifenilterazolio (TTC) può essere usata in sala autoptica per una diagnosi preliminare di infarto miocardico acuto. Una sezione ventricolare spessa 1 cm dovrebbe essere selezionata e immersa in una soluzione neutra di TTC per 10-20 minuti a 37°C.

11. Una volta svuotato il cuore dal sangue, dovrebbero sempre essere prese le seguenti misure:

a. Peso totale del cuore: confrontarlo con i dati tabellati dei pesi per età, genere e rapporto peso/altezza corporea;

b. Spessore della parete: osservare attentamente l'endocardio, misurare lo spessore a metà della cavità della parete libera del ventricolo destro e sinistro e del setto interventricolare. Misurazioni aggiuntive possono essere fatte per stimare le dimensioni delle camere. Il diametro trasverso è meglio calcolato come la distanza tra il margine ottuso al margine acuto nel solco

atrio-ventricolare posteriore. Il diametro longitudinale è ottenuto dalla misurazione della distanza tra la crux cordis (punto in cui il solco atrio-ventricolare incontra il solco interventricolare posteriore) e l'apice del cuore sul lato posteriore.

12. Dissezionare i rimanenti ventricoli destro e sinistro nella metà basale del cuore, secondo la direzione del flusso di sangue. Completare l'esame dei setti atriali e ventricolari, delle valvole atrio-ventricolari, dell'afflusso ed efflusso ventricolare e delle valvole semilunari^{72, 73}.

Esame istologico standard del cuore

Per lo studio miocardico è necessario prelevare da una sezione trasversa rappresentativa dei ventricoli, dei blocchi mappati e contrassegnati per includere in paraffina la parete libera del ventricolo sinistro (anteriore, laterale e posteriore), il setto ventricolare (anteriore e posteriore) e la parete libera del ventricolo destro (anteriore, laterale, posteriore) oltre al tratto di efflusso del ventricolo destro. Le sezioni miocardiche del ventricolo sinistro dovrebbero includere i muscoli papillari. Inoltre, dovrebbe essere prelevato un blocco da ciascun atrio e da ogni area con anomalie macroscopiche. Le colorazioni di Ematossilina-Eosina e del tessuto connettivo (Van Giesen, tricromica o Sirius red) rappresentano lo standard. Altre colorazioni speciali e l'immunoistochimica dovrebbero essere svolte su richiesta.

Per quanto riguarda le arterie coronarie, nel contesto di una coronaropatia le lesioni focali più severe dovrebbero essere campionate per l'esame istologico in blocchi etichettati e colorati come descritto sopra.

Altri campioni cardiaci (come il tessuto valvolare, il pericardio e l'aorta) sono indicati.

Se la storia clinica o i tracciati ECG suggeriscono una conduzione anomala, il cuore dovrebbe essere inviato **intatto** presso centri specializzati.

La selezione dei blocchi per la valutazione istologica del sistema di conduzione richiede particolare esperienza e di solito sono richieste sezioni seriate. Secondo l'opinione di esperti, è quindi preferibile e consigliato che il cuore sia prelevato in toto e inviato presso centri specializzati⁷⁴. Nel caso in cui il cuore non possa essere conservato, è fondamentale che sia fatta una documentazione fotografica completa indicando le sedi da cui sono stati prelevati i

⁷² Ashwell, M. & Gibson, S. Waist-to-height ratio as an indicator of 'early health risk': simpler and more predictive than using a 'matrix' based on BMI and waist circumference. *BMJ Open* **6**, e010159 (2016).

⁷³ Basso, B. C. *et al.* Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv* **452**, 11–18 (2008).

⁷⁴ Thiene, G. *et al.* AECVP and SCVP 2009 Recommendations for Training in Cardiovascular Pathology. *Cardiovascular Pathology* **19**, 129–135 (2010).

diversi campioni. Almeno una sezione trasversa del cuore che comprenda i ventricoli destro e sinistro dovrebbe essere conservata per ulteriori indagini.

Campioni provenienti dagli altri organi principali dovrebbero essere prelevati in maniera routinaria e colorati con Ematossilina e Eosina ed altre colorazioni appropriate.³

Documentazione fotografica

I moderni metodi di documentazione fotografica e registrazione video consentono un'accurata documentazione di un'anatomia normale e anormale.⁷⁵ Sono una parte essenziale dell'autopsia forense ma sono anche preziosi nella morte improvvisa naturale. Il verbale autoptico con la descrizione del cuore, con misure, pesi e accompagnata da un dettagliato report fotografico, rappresenta quindi la testimonianza permanente del caso. Tutto ciò è di particolare importanza quando il cuore non può essere conservato.

Le foto devono essere scattate prima che siano sezionati i blocchi istologici dal cuore, i quali devono contenere un numero identificativo e una scala di riferimento.³

Imaging post-mortem

L'uso dell'imaging post-mortem nelle indagini di morte improvvisa non è attualmente raccomandato dalla task force AECVP, che però ne riconosce il valore aggiunto in specifiche condizioni.

Nelle morti cardiovascolari, l'RX tradizionale e la TC post-mortem sono d'aiuto nel visualizzare emoperitonei, placche o valvole calcifiche, e nell'identificare e localizzare device cardiovascolari. La tecnica angiografica fornisce invece visioni dettagliate della distribuzione delle coronarie epicardiche, informazioni sull'estensione e localizzazione di stenosi e ostruzioni arteriose, e soprattutto mostra la pervietà di stent e bypass coronarici⁷⁵. Il semplice RX e la coronarografia svolti su cuori isolati sono semplici e più accessibili rispetto ad esami total-body; in aggiunta la coronarografia può essere effettuata immediatamente dopo la rimozione del cuore usando un piccolo sistema a camera. Metodiche di imaging total-body come TC e RM post-mortem, con o senza angiografia, sono molto usate, soprattutto nella pratica forense.

Indagini laboratoristiche aggiuntive:

Analisi aggiuntive come valutazioni tossicologiche, biochimiche, microbiologiche o genetiche, possono essere richieste al momento dell'autopsia o in una fase successiva, e in

⁷⁵ Kornegoor, R., Brosens, L. A. A., Roothaan, S. M., Smits, A. J. J. & Vink, A. Digitalization of post-mortem coronary angiography. *Histopathology* **55**, 760–761 (2009).

assenza di strutture idonee in loco, i materiali raccolti dovrebbero essere spediti presso centri locali o regionali specializzati. Nella tabella seguente (Tabella 2), sono riportati i campioni che dovrebbero essere prelevati per le successive analisi secondo le raccomandazioni nazionali e internazionali per l'autopsia forense:

Tabella 2 – Campioni per test di laboratorio aggiuntivi nella Morte Improvvisa		
Campione	Quantità	Analisi
Sangue venoso periferico	10-20 ml	Tossicologia, genetica, virologia, biochimica
Umor vitreo	5-10 ml	Tossicologia, biochimica
Capelli	Ciocche	Tossicologia
Urine	10-20 ml	Tossicologia, biochimica
Bile	Tutta	Tossicologia
Liquido pericardico/cerebrospinale	5-10 ml	Tossicologia, biochimica
Contenuto gastrico	Tutto	Tossicologia
Campioni di altri tessuti (fegato, polmoni, reni, encefalo, grasso sottocutaneo e muscolo scheletrico)	25-50 g	Tossicologia
Cuore/milza	5 g	Genetica, virologia
Colture ematiche o tissutali	5-10 g	Microbiologia, genetica
Campioni di miocardio e altri tessuti	1x1x1 mm	Analisi ultrastrutturali (microscopio elettronico)

Tossicologia

In tutti i casi di Morte Improvvisa, dovrebbe sempre essere considerata attentamente un possibile coinvolgimento di sostanze stupefacenti e valutando la possibilità che droghe o

farmaci possano aver scatenato la morte agendo come fattori aggiuntivi al substrato anatomico⁷⁶. Nei casi di decesso in atleti, specie di età giovanile, deve essere considerato il possibile ruolo di sostanze assunte ad uso dopante.

Ai fini dell'indagine sulla morte improvvisa, le seguenti quantità sono adattate dalle Linee guida della Society of Forensic Toxicologists e dall'American Academy of Forensic: sangue cardiaco 25 ml, sangue periferico da vene femorali 10 ml, urina 30-50 ml, bile 20–30 ml (quando l'urina non è disponibile). Tutti i campioni sono conservati a 4 ° C. Una ciocca di capelli (100-200 mg) dovrebbe essere tagliata dalla parte posteriore della testa (o dai peli pubici quando i peli della testa non sono disponibili). Le analisi tossicologiche dovrebbero essere quantitative.

L'interpretazione dei risultati tossicologici può essere difficile. La quantificazione dei livelli di farmaco è essenziale, e non la sua semplice identificazione; esperti possono essere necessari per stabilire se il livello di una specifica sostanza sia all'intero del suo range terapeutico o sia potenzialmente o certamente tossica. Inoltre, cambiamenti sostanziali nei livelli ematici delle sostanze possono presentarsi nel tempo che intercorre tra la morte e l'autopsia. Questi cambiamenti non sono facilmente identificabili attraverso i campionamenti post-mortem e le analisi tossicologiche poiché sono correlati alla degradazione dei farmaci, redistribuzione post-mortem e farmacogenomica individuale.

Biochimica

L'indagine biochimica post-mortem è utile nella diagnosi di morti dovute a disordini metabolici, come le chetoacidosi alcoliche e diabetiche, i disordini elettrolitici, anafilassi o anche condizioni in cui è presente una risposta prolungata allo stress termico come l'ipotermia; inoltre può essere utile nella diagnosi di processi patologici, tra cui infiammazioni, infarti miocardici precoci e nelle sepsi⁷⁷.

L'interpretazione dei dati chimici post-mortem è limitata dalla mancanza di conoscenze di range di riferimento con i valori in vita, poiché questi vengono modificati da effetti di autolisi, altri cambiamenti post-mortali, e dipendono dall'intervallo di tempo intercorso tra la morte e il campionamento.

⁷⁶ Bjune, T. *et al.* Post-mortem toxicology in young sudden cardiac death victims: a nationwide cohort study. *EP Europace* **20**, 614–621 (2018).

⁷⁷ Belsey, S. L. & Flanagan, R. J. Postmortem biochemistry: Current applications. *Journal of Forensic and Legal Medicine* **41**, 49–57 (2016).

Microbiologia

Tecniche molecolari come la PCR, sia sul tessuto miocardico che sul sangue, rappresentano il gold standard per la diagnosi di miocarditi virali⁷⁸ che sono una delle principali cause di MCI nei giovani. Poiché le miocarditi virali si caratterizzano per una distribuzione multifocale dei cluster infiammatori e di necrosi, è raccomandata la raccolta di plurimi campioni di miocardio. Almeno 5 campioni di 5 mm³ di cui due provenienti dalla parete libera del ventricolo sinistro, una dalla parete del setto e due dal miocardio del ventricolo destro. I campioni dovrebbero essere conservati a -80 °C. Inoltre, campioni di milza e sangue intero conservato con EDTA possono dimostrare una presenza più estesa del virus in alcuni casi di miocarditi fulminanti virali.⁸⁵

Grazie alla PCR real-time è possibile valutare nel tessuto i livelli di mRNA codificanti per l'interleuchina 10, la cui espressione può essere considerata come un biomarker indiretto di un'infezione cardiaca virale; inoltre, il numero di copie per microgrammo sull'estratto totale degli acidi nucleici è un indicatore di miocardite considerato affidabile. Per quanto riguarda il PVB19, la soglia della carica virale è rappresentata da 500 copie per microgrammo, e quando risulta inferiore a tale valore, è improbabile che il Parvovirus sia la causa della morte improvvisa⁸⁵ dato che spesso è uno spettatore innocente⁷⁹.

Batteri e parassiti sono cause meno frequenti di MCI e, in questo caso, campioni di miocardio e sangue periferico sono sottoposti a coltura. In caso di batteri responsabili di patologie come, come la malattia di Lyme, la tubercolosi, la brucellosi e la sifilide, devono essere svolte colture specifiche, sierologia, e/o tecniche molecolari come l'amplificazione alla PCR dell'rRNA 16S seguito dalle tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) sul tessuto cardiaco. Le tecniche molecolari richiedono la classica estrazione da campioni congelati, prelevati durante l'autopsia⁸⁰.

⁷⁸ Basso, C., Calabrese, F., Angelini, A., Carturan, E. & Thiene, G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev* **18**, 673–681 (2013).

⁷⁹ Nielsen, T. S., Hansen, J., Nielsen, L. P., Baandrup, U. T. & Banner, J. The presence of enterovirus, adenovirus, and parvovirus B19 in myocardial tissue samples from autopsies: an evaluation of their frequencies in deceased individuals with myocarditis and in non-inflamed control hearts. *Forensic Sci Med Pathol* **10**, 344–350 (2014).

⁸⁰ Fernández-Rodríguez, A. *et al.* Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings. *Clinical Microbiology and Infection* **25**, 570–579 (2019).

2.5 SUD (Sudden unexplained death)

Purtroppo, anche quando viene eseguita l'autopsia, una proporzione di morti improvvise, molto variabile nelle diverse casistiche (da 2 al 30%), rimangono inspiegabili, in assenza di anomalie cardiache strutturali evidenti (morte improvvisa *sine materia o Sudden unexplained death*).^{81,82,83,84.}

Viene definita SUD la situazione in cui la causa di morte rimane sconosciuta dopo un esame autoptico completo in cui il cuore è strutturalmente normale, dopo esame anatomico patologico non sono presenti alterazioni microscopiche; non sono state identificate altre cause di morte all'esame post-mortale; l'approfondimento tossicologico è normale; e 5) la valutazione della storia clinica, anamnestica e anche delle modalità in cui è avvenuto il decesso sono negativi. Ciò si verifica in più del 30% delle autopsie nei giovani, suggerendo fortemente una causa aritmica sottostante.^{85, 86.}

Per quasi la metà delle vittime da 1 a 35 anni di età, non ci sono segnali di pericolo evidenti e la morte improvvisa spesso si verifica come l'evento sentinella che rende imprescindibili le indagini forensi per determinare la causa e le modalità della morte^{87, 88.}

Peraltro, come detto precedentemente, l'esecuzione di accertamenti autoptici nei casi di morte improvvisa non è diffusa né tantomeno lo è quella della cosiddetta "autopsia molecolare", soprattutto a fronte di reperti anatomico-patologici di normalità, per cui è difficile da ottenere una stima attendibile della reale incidenza della SUD.

I progressi nel campo della biologia molecolare e della genetica umana hanno identificato l'origine genetica di molte malattie cardiache responsabili di Morte Cardiaca Improvvisa giovanile e nella Sindrome della morte improvvisa infantile (SIDS) e si stima che

⁸¹ Autore C., Pagannone E., et Al., *Screening cardiologico delle famiglie con storia di morte improvvisa giovanile: quali patologie ricercare e con quali strumenti* G Ital Cardiol Vol 11 Luglio-Agosto 2010

⁸² *Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology* S. G. Priori, E. Aliot, C. Blomstrom-Lundqvist, L. Bossaert, G. Breithardt, P. Brugada, A. J. Camm, R. Cappato, S. M. Cobbe, C. Di Mario, B. J. Maron, W. J. McKenna, A. K. Pedersen, U. Ravens, P. J. Schwartz, M. Trusz-Gluza, P. Vardas, H. J. J. Wellens and D. P. European Heart Journal (2001) 22, 1374– 1450.

⁸³ Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Cardiac channel molecular autopsy: insights from 173 consecutive cases of autopsy-negative sudden unexplained death referred for postmortem genetic testing. *Mayo Clin Proc* 2012; 87:524-39

⁸⁴ Chugh SS, Kelly KL, Titus JL. Sudden cardiac death with apparently normal heart. *Circulation* 2000; 102:649-54.

⁸⁵ Semsarian, C., Ingles, J. & Wilde, A. A. M. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European Heart Journal* 36, 1290–1296 (2015).

⁸⁶ David C A Candy, *Sudden unexplained death: evaluation of those left behind* THE LANCET Vol 362 November 1, 2003

⁸⁷ Oliva A, Brugada R, D'Aloja E, Boschi I, Partemi S, Brugada J, Pascali VL. State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death, *Am J Forensic Med Pathol.* 2011 Mar; 32 (1): 1-16

⁸⁸ Liberthson RR, *Sudden death from cardiac causes in children and young adult*, N Engl J Med. 1996 Apr 18;334(16):1039-44

il 10-35%⁸⁹ delle SUD possa essere spiegata dalle canalopatie cardiache che interessano il ritmo cardiaco e la conduzione elettrica cardiaca.

Le canalopatie cardiache comprendono un gruppo di sindromi ereditabili come la sindrome del QT lungo (LQT), la tachicardia ventricolare polimorfa catecolaminergica (CPVT), la sindrome di Brugada, la sindrome del QT corto (SQTS), e la fibrillazione atriale familiare (AF).⁹⁰

Poiché molte di queste malattie sono ereditarie, stabilire una diagnosi post mortem di una vittima di MCI è di assoluto rilievo per i familiari del deceduto in quanto la MCI può essere prevenuta se viene avviato il trattamento appropriato nei soggetti portatori di queste mutazioni⁹¹.

Già nel 2007, Wedekind dichiarò che i test genetici post mortem dovevano essere considerati come parte dell'indagine medica completa sui casi di morte cardiaca improvvisa senza apparenti malattie cardiache strutturali, tenendo conto delle implicazioni per i familiari viventi⁹². Stabilire una diagnosi può prevenire futuri eventi cardiaci con l'assistenza di una consulenza esperta, un adeguato adattamento dello stile di vita e un trattamento farmacologico, se disponibile.

Nonostante le raccomandazioni e i vantaggi dell'autopsia molecolare, solo pochi centri di ricerca la stanno attualmente eseguendo nella pratica forense standard⁹³. Infatti, se le autopsie molecolari sono ampiamente utilizzate a fini di ricerca, nella pratica forense spesso nemmeno indagini più “basilari” non vengono eseguite sistematicamente. Quando viene eseguita un'autopsia, non sempre viene eseguito un esame istologico del miocardio e spesso non vengono svolte indagini più approfondite, come l'esame dei tessuti di conduzione, immunoistochimica, microscopia elettronica e misurazione dei marker biochimici.

Un morte improvvisa, dal punto di vista forense, di norma viene eseguita con il fine di accertare se la causa della morte deve essere attribuita a cause naturali o se ci sono ipotesi di

⁸⁹ M. Arnestad, L. Crotti, T.O. Rognum, R. Insolia, M. Pedrazzini, C. Ferrandi, et al., Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome, *Circulation* 115 (2007) 361–367.

⁹⁰ Yingying Tang, Jay Stahl-Herz, Barbara A. Sampson. *Molecular diagnostics of cardiovascular diseases in sudden unexplained death*, *Cardiovascular Pathology* 23 (2014) 1–4

⁹¹ Hellenthal N, Gaertner-Rommel A, Klauke B, Paluszkiwicz L, Stuhr M, Kerner T, Farr M, Püschel K, Milting H. Molecular autopsy of sudden unexplained deaths reveals genetic predispositions for cardiac diseases among young forensic cases. *Europace*. 2017 Nov 1;19(11):1881-1890. doi: 10.1093/europace/euw247. PubMed PMID: 29016939.

⁹² Tominaga, M. *et al.* Efficacy of drug screening in forensic autopsy: Retrospective investigation of routine toxicological findings. *Legal Medicine* 17, 172–176 (2015).

⁹³ Michaud K, Mangin P, Elger BS. Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices. *Int J Legal Med*. 2011 May;125(3):359-66. doi: 10.1007/s00414-010-0474-0. Epub 2010 Jun 11. PubMed PMID: 20535491.

reato. Nei casi non sia possibile giungere a un preciso substrato patologico, il proseguo degli accertamenti genetici della malattia e l'informazione ai membri della famiglia non fanno necessariamente parte dell'obiettivo delle autopsie giudiziarie, i cui accertamenti laboratoristici a corollario delle attività autoptiche di medicina legale sono a carico della pubblica amministrazione.

2.6 Autopsia molecolare dei casi di SUD: test genetici predittivi

Allo stato attuale, la diagnostica molecolare non è comunemente applicata come parte dell'indagine medica e forense dei casi di SUD e l'applicazione dei test di routine nelle indagini forensi è molto limitata^{94, 95}.

Se nella maggioranza dei casi, l'indagine autoptica nella MCI è in grado di identificare cause strutturali, che possono essere congenite o acquisite, alla base del quadro patologico; tuttavia, in un numero non limitato di casi, l'autopsia risulta “bianca”⁹⁶.

Poiché molte di queste malattie sono ereditarie, stabilire una diagnosi post mortem di una vittima di MCI è molto importante per i familiari del deceduto.

Tuttavia, recentemente l'autopsia molecolare, ovvero i test genetici eseguiti post-mortem, sono stanno assumendo sempre maggior rilievo. Le linee guida ESC del 2015 per la prevenzione di MCI in soggetti con aritmia ventricolare, affermano infatti che l'autopsia molecolare dovrebbe essere considerata in tutte le vittime di morte improvvisa nelle quali sia sospettata una canalopatia o cardiomiopatia ereditaria (Classe di raccomandazione IIa, livello di evidenza C)⁹⁷.

Anche le attuali linee guida autoptiche AECVP sottolineano l'importanza di eseguire test genetici post-mortem nelle cosiddette “morti bianche” o “mors sine materia”, purtroppo però questi vengono svolti raramente; le cause di ciò possono essere attribuite a diversi fattori

⁹⁴ K. Michaud, P. Mangin, B.S. Elger, *Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices*, Int. J. Legal Med. 125 (2011) 359–366.

⁹⁵ David C A Candy, *Sudden unexplained death: evaluation of those left behind*, The Lancet Vol 362 November 1, 2003

⁹⁶ Basso, C. *et al.* Sudden cardiac death with normal heart: molecular autopsy. *Cardiovasc. Pathol.* **19**, 321–325 (2010).

⁹⁷ Priori, S. G. *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* **36**, 2793–2867 (2015).

tra cui i costi delle analisi genetiche e le implicazioni etiche che deriverebbero per i familiari una volta ottenuti i risultati^{98,99}.

L'importanza dell'esecuzione dell'autopsia molecolare deriva da fatto che un'attuazione routinaria dei test genetici consentirebbe una diagnosi nei casi di autopsie bianche e i parenti potrebbero avere una spiegazione per la morte, e potrebbero essere offerti test predittivi ai membri della famiglia¹⁰⁰. Uno studio condotto in Svezia analizzando le Sudden Unexplained Death (SUD) verificatesi tra il 2009 e il 2011 nei giovani compresi tra 1 e 35 anni, ha messo in evidenza come nel 40% dei casi sia stato possibile individuare una variante patogena al test genetico.⁹³ Dati sovrapponibili sono stati ottenuti in Spagna con uno studio condotto su 789 casi di SUD in individui <50 anni in cui sono stati eseguiti test genetici in caso di sospetto di cardiomiopatia ereditaria o morte inspiegata, identificando potenziali varianti patologiche rispettivamente nel 50% e 40% dei casi¹⁰¹. Altri studi suggeriscono come il 10-15% dei campioni provenienti da casi di MCI, portino una mutazione nei geni KCNQ1, KCNH2 o SCN5A; tale percentuale sale fino al 15-25% se si esegue uno screening anche per il gene RYR2¹⁰². Infine in uno studio svolto in Nuova Zelanda e Australia tra il 2010 e il 2012 su casi di MCI in giovani da 1 a 35 anni, nel 27% dei casi sono state identificate mutazioni in geni cardiaci clinicamente rilevanti; ai successivi follow-up è stata poi fatta diagnosi di una malattia cardiovascolare ereditaria nel 13% delle famiglie in cui si era verificata una MCI inspiegata.⁹⁶ Anche un altro studio esaminato ha permesso di identificare ai successivi test genetici dei casi di SUD il 27% mutazioni potenzialmente rilevanti aritmogeniche e correlate a MCI.¹⁰³

Ad oggi sembra quindi ragionevole sostenere un approccio combinato con una valutazione clinica dei membri della famiglia delle vittime di SUD e l'autopsia molecolare eseguita sul probando. Nel caso in cui il test genetico sia "positivo" nelle vittime di MCI inspiegata, screening genetici a cascata possono essere estesi per le stesse "varianti" ai parenti di primo grado della vittima, identificando una sindrome aritmica ereditaria in circa il 50% delle

⁹⁸ Wilhelm, M. *et al.* Sudden cardiac death in forensic medicine – Swiss recommendations for a multidisciplinary approach. *Swiss Medical Weekly* (2015). doi:10.4414/sm.w.2015.14129

⁹⁹ Girolami, F. *et al.* Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *Journal of Cardiovascular Medicine* **19**, 1–11 (2018).

¹⁰⁰ Stattin, E.-L. *et al.* Genetic screening in sudden cardiac death in the young can save future lives. *International Journal of Legal Medicine* **130**, 59–66 (2016).

¹⁰¹ Sanchez, O. *et al.* Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation. *PLoS ONE* **11**, e0167358 (2016).

¹⁰² Thiene, G. Sudden cardiac death in the young: a genetic destiny? *Clin Med* **18**, s17–s23 (2018).

¹⁰³ Kaufenstein S, Kiehne N, Jenewein T, Biel S, Kopp M, König R, Erkapic D, Rothschild M, Neumann T. Genetic analysis of sudden unexplained death: a multidisciplinary approach. *Forensic Sci Int.* 2013 Jun 10;229(1-3):122-7. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.050. Epub 2013 Apr 30. PubMed PMID: 23683917.

famiglie. Ciò fornisce una probabile causa di morte e identifica familiari in vita a rischio di incorrere nella stessa sorte¹⁰⁴.

I vantaggi associati all'esecuzione di test genetici post-mortem sono quindi:

1. Stabilire la causa e la modalità della morte, acquisendo informazioni aggiuntive che interessano il gruppo biologico di appartenenza;
2. Confermare o escludere la presenza di mutazioni responsabili della malattia in correlati pre-sintomatici di vittime di morte improvvisa;
3. Fornire raccomandazioni terapeutiche personalizzate assicurando la presa in carico dei familiari che mostrano la mutazione genetica ai fini di prevenzione¹⁰⁵.

Attualmente la raccolta di DNA per analisi post mortem su mutazioni associate a MCI nei giovani non è una pratica di routine in medicina legale o patologia, rispettivamente. Poiché sono ora disponibili tecniche per il sequenziamento ad alto rendimento NGS e la MCI ha un rilevante impatto sociale per i familiari, la conservazione del DNA dovrebbe essere sicuramente integrata nella pratica dell'autopsia¹⁰⁶

Geni candidati

I geni che possono essere coinvolti in aritmie letali e cardiomiopatie sono numerosi. Ogni gene potrebbe potenzialmente essere testato con un'analisi genetica, ma è stato dimostrato come il miglior rapporto costo-efficienza sia ottenuto dall'analisi di soli 4 geni: SCN5A, KCNQ1, KCNH2 e RyR2¹⁰⁷, alla luce anche delle sovrapposizioni di geni coinvolti nella patogenesi di più canalopatie.

Recentemente sono state sviluppate nuove tecnologie, definite Next Generation Sequencing, che consentono di sequenziare molti geni in una volta, in poche ore e a basso costo. Sono state usate diverse piattaforme NGS per lo screening genetico di patologie cardiache ereditarie: due piattaforme MiSeq e Ion Torrent PGM che indagano 6 geni (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2 e RyR2) e pannelli che studiano geni correlati a cardiomiopatie (MYH7, MYBPC3, MYL2, LMNA, SCN5A, TNNT2, TNNI3 e TPM1)¹⁰⁸.

¹⁰⁴ Thiene, G. Sudden cardiac death in the young: a genetic destiny? *Clin Med* **18**, s17–s23 (2018).

¹⁰⁵ Tester, D. J. & Ackerman, M. J. Evaluating the survivor or the relatives of those who do not survive: the role of genetic testing. *Cardiol Young* **27**, S19–S24 (2017).

¹⁰⁶ Hellenthal N, Gaertner-Rommel A, Klauke B, Paluszkiwicz L, Stuhr M, Kerner T, Farr M, Püschel K, Milting H. Molecular autopsy of sudden unexplained deaths reveals genetic predispositions for cardiac diseases among young forensic cases. *Europace*. 2017 Nov 1;19(11):1881-1890. doi: 10.1093/europace/euw247. PubMed MID: 29016939.

¹⁰⁷ Campuzano, O. *et al.* Negative autopsy and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine* **128**, 599–606 (2014).

¹⁰⁸ Morini, E., Sangiuolo, F., Caporossi, D., Novelli, G. & Amati, F. Application of Next Generation Sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death. *Front Genet* **6**, 55 (2015).

Table 1: Spectrum of the most frequent inherited cardiomyopathies and ion channel disorders (channelopathies) associated with sudden cardiac death.			
Disorder	Inheritance	Number of known genes	Yield of the genetic test
Cardiomyopathies			
Hypertrophic cardiomyopathy	Usually AD	~ 30	60%
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	Usually AD/AR	12	50%
Dilated cardiomyopathy	Usually AD	~ 40	10–40%
Left ventricular non-compaction cardiomyopathy	AD	> 10	15–20%
Channelopathies			
Long QT syndrome	AD/AR	15	70%
Brugada syndrome	AD	21	15–30%
Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	AD/AR	6	50–60%
Short QT syndrome	AD/AR	5	5–10%
AD = autosomal dominant; AR = autosomal recessive			

Fig. 2 tabella rappresentante le più frequenti cardiomiopatie ereditarie e disordini dei canali ionici associati a MCI

Materiale biologico da sottoporre ad analisi

Grazie alla facilità di conservazione e trasporto, i tessuti fissati e inclusi in paraffina (fixed-paraffin-embedded tissue, FF-PET) rappresentano la forma più diffusa di archiviazione usata dai patologi generali e forensi, e l'unica fonte disponibile per acquisire DNA. Il DNA ottenuto dai FF-PET può essere usato nelle diagnosi cliniche, come test per il cancro, ma di solito il DNA è degradato dalla formalina e per questo gli FF-PET rappresentano delle fonti subottimali per i test genetici post-mortem¹⁰⁹. Al contrario, il sangue raccolto nell'acido etilendiamminicotetracetico (EDTA) oppure cuore, fegato o milza congelati, rappresentano le principali fonte di DNA intatto, consentendo performance di successo nei test genetici post-mortem per le canalopatie. Inoltre, dovrebbero essere ottenuti almeno 10 ml di sangue EDTA o 5 g di tessuto fresco dall'autopsia, e il tessuto dovrebbe essere conservato a -80°C prima che il DNA sia estratto. In alternativa, possono essere usati per l'autopsia molecolare da 50 a 100 µl di sangue su carta da filtro; ma comunque questo tende a procurare un basso contenuto di DNA.⁶² Il DNA però non rappresenta l'unica fonte per lo studio post-mortem: l'analisi dell'espressione degli mRNA sui tessuti ottenuti da cuori patologici e non, può essere una risorsa molto utile per studiare l'espressione dei canali del Na⁺ e del K⁺.¹¹⁰

Ulteriori analisi nei casi di SUD:

¹⁰⁹ Thiene, G. *et al.* Postmortem Genetic Testing for Conventional Autopsy–Negative Sudden Unexplained Death: An Evaluation of Different DNA Extraction Protocols and the Feasibility of Mutational Analysis from Archival Paraffin-Embedded Heart Tissue. *American Journal of Clinical Pathology* **129**, 391–397 (2008).

¹¹⁰ Campuzano, O. *et al.* Negative autopsy and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine* **128**, 599–606 (2014).

Farmacogenetica: applicazioni cliniche e risvolti medico-legali

La farmacogenetica è la disciplina che studia come la genetica influenzi gli esiti dei trattamenti farmacologici, ed è di estrema importanza dato che le reazioni avverse ai farmaci costituiscono la 4^a causa di morte al mondo.

Una sua applicazione post-mortem può essere utile, invece, per risolvere casi di morti improvvise inspiegate, che diversamente rimarrebbero categorizzate come SUD (Sudden Unexplained Death)¹¹¹.

Il completo utilizzo della farmacogenetica post-mortem è possibile solo *integrando patologia forense, tossicologia e genetica*. La conoscenza delle condizioni fisiopatologiche dell'individuo, delle concentrazioni di tutti i farmaci e dei loro metaboliti rilevanti nel corpo al momento della morte, combinata al genotipo dell'individuo, potrebbe aiutare nel predire le risposte individuali ai farmaci.

Ciò è spiegato dal fatto che l'effetto prodotto dal farmaco non dipende solo dalla genetica dell'individuo, ma anche da altri fattori: fase di sviluppo (età, sesso), fattori fisiologici (stress mentale e fisico, cambiamenti ormonali), fattori ambientali (dieta, stile di vita, tossici ambientali, alcol e droghe), e associazioni con patologie o specifiche condizioni (LQTS, diabete, obesità, microbiota intestinale, ecc.); tutto ciò rende necessaria una valutazione complessa.

Allungamento farmaco-indotto dell'intervallo QT

La letteratura internazionale riporta spesso l'associazione tra l'utilizzo di molti farmaci e l'allungamento del tempo di ripolarizzazione ventricolare cardiaca (intervallo QT), strettamente correlato a un aumentato rischio di sviluppare aritmie cardiache fatali e torsione di punta (TdP)¹¹².

Valutare la predisposizione genetica di un individuo all'allungamento farmaco-indotto dell'intervallo QT, rappresenta un'utile applicazione della farmacogenetica nei casi di MCI e SUD. Un allungamento del tratto QT è un fattore di rischio noto per lo sviluppo di aritmie ventricolari e MCI, e può essere congenito o acquisito. Le forme congenite, come descritto nel precedente capitolo, sono dovute ad alterazioni genetiche; le forme acquisite possono essere dovute a patologie cardiache, come coronaropatie e insufficienza cardiaca, ma sono di solito

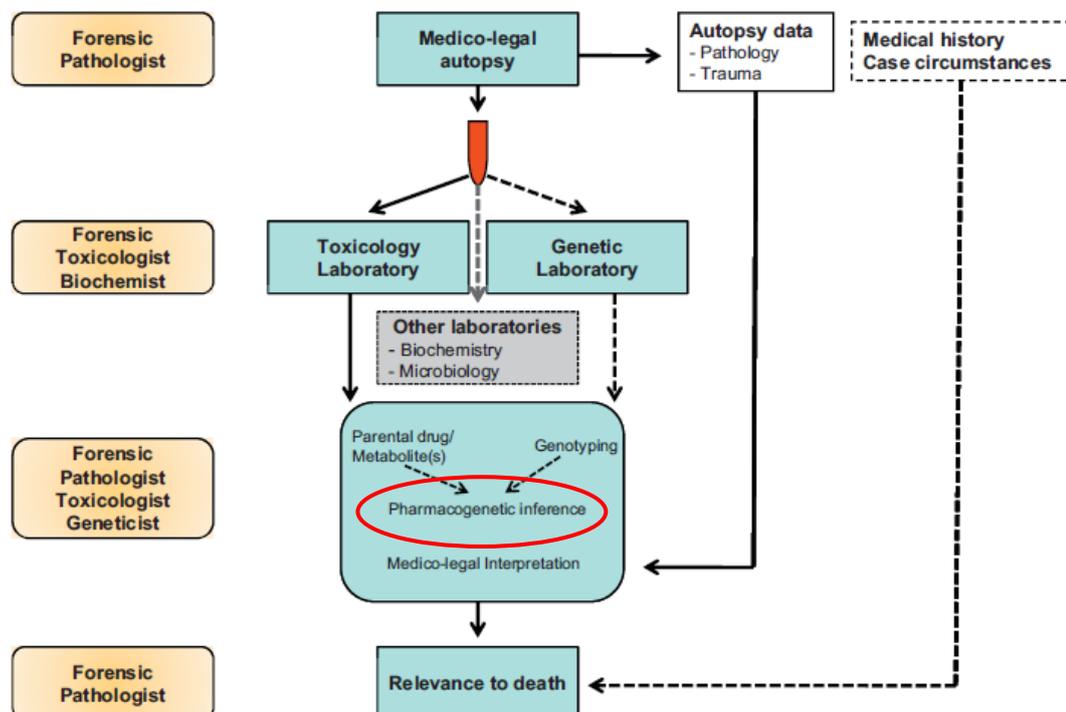
¹¹¹ Sajantila, A., Palo, J. U., Ojanperä, I., Davis, C. & Budowle, B. Pharmacogenetics in medico-legal context. *Forensic Science International* 203, 44–52 (2010).

¹¹² Camm AJ. Clinical trial design to evaluate the effects of drugs on cardiac repolarization: current state of the art. *Heart Rhythm* 2005;2: S23-S29.

indotte da farmaci. La suscettibilità all'allungamento acquisito dell'intervallo QT può essere inoltre influenzata da variazioni genetiche.

I geni rilevanti dal punto di vista farmacocinetico sono quelli codificanti per i citocromi P450, enzimi che metabolizzano i farmaci a livello epatico, e per la glicoproteina P, una pompa transmembrana che espelle diversi farmaci dal citoplasma cellulare ed è codificata dal gene per l'ATP-binding cassette B1 (ABCB1). Sul piano farmacodinamico invece, i geni coinvolti sono gli stessi che partecipano alla LQTS e NOS1A, il gene che codifica per la proteina attivante l'ossido nitrico sintasi 1 e regola l'enzima neuronale ossido nitrico sintasi (nNOS), un regolatore dei livelli di calcio intracellulari e della contrazione dei cardiomiociti. È stato dimostrato che alcune varianti di NOS1P definiscono un aumentato rischio di allungamento del QT indotto da antiaritmici, diuretici e antidepressivi; mentre alterazioni in alcuni citocromi, come CYP3A4 e CYP2C9, predispongono ad allungamento del QT e torsioni di punta, in caso di somministrazione di antimicrobici¹¹³. È noto, peraltro, che i metabolizzatori lenti geneticamente determinati, hanno un maggior rischio di sviluppare intossicazioni da farmaci.¹⁰⁷

Tali geni potrebbero quindi essere utili per una valutazione complessiva del caso studiato, durante l'autopsia molecolare.



¹¹³ Niemeijer, M. N., van den Berg, M. E., Eijgelsheim, M., Rijnbeek, P. R. & Stricker, B. H. Pharmacogenetics of Drug-Induced QT Interval Prolongation: An Update. *Drug Saf* **38**, 855–867 (2015).

Fig.3: Struttura per la genetica medico-legale e l'interazione tra patologi forensi, tossicologi e genetisti nelle indagini farmacogenetiche post mortem. Da *Pharmacogenetics in medico-legal context: Forensic Science International*, Sajantila, A., Palo, J. U., Ojanperä, I., Davis, C. & Budowle, B., 2010.

Quando i risultati della autopsia forense sono difficili da interpretare, può essere utile che il patologo forense richieda ulteriori test genetici per indagare su potenziali interferenze farmacogenetiche. Un corretto percorso è indicato in Fig.3. Questi risultati genetici e l'interpretazione medico-legale, dovrebbero poi essere discussi con il patologo forense, il tossicologo e il genetista in una valutazione collegiale. In ultima analisi però, la decisione sulla rilevanza dei risultati per definire la causa e le modalità di morte, rimane nelle mani del medico-legale. Infine, esperti di altre discipline, come biochimici e microbiologi, potrebbero essere necessari per comprendere le interferenze farmacogenetiche, alla luce dei possibili fattori eterni potenzialmente coinvolti¹¹⁴.

2.7 Consenso Informato: un problema etico e medico-legale

Nel contesto di un'indagine forense, il consenso esplicito è di solito non richiesto per le indagini post mortem.

Per acquisita norma legale il cadavere non è equiparabile a un bene e, pertanto, non può appartenere a nessuno. Ne deriva che, trovandosi nell'impossibilità di decidere autonomamente e non essendo soggetto a decisioni altrui, i suoi tessuti possono, senza alcuna autorizzazione da parte dei familiari o congiunti, essere oggetto di accertamenti clinici anche genetici e su patologie costituzionali.

In ambito forense, dal momento che il test genetico è svolto allo scopo di determinare le cause e i mezzi della morte il consenso non è richiesto dal punto di vista legale nel caso in cui il l'esame sia dirimente per le indagini di morte. Qualora il medico legale a cui è stata affidata l'esecuzione dell'autopsia ritenga utile ai fini diagnostici effettuare indagini genetiche per definire la causa del decesso, può farlo in autonomia decisionale, rispondendo al massimo, su di un piano squisitamente finanziario, circa la valutazione dell'utilità e adeguatezza delle

¹¹⁴ Sajantila, A., Palo, J. U., Ojanperä, I., Davis, C. & Budowle, B. *Pharmacogenetics in medico-legal context. Forensic Science International* **203**, 44–52 (2010).

stesse (cioè se la loro esecuzione sia stata motivata dal fallimento delle indagini precedentemente previste ed eseguite).

In Italia, secondo l'articolo 116 delle norme di attuazione del c.c.p., il PM (Pubblico Ministero) può ordinare l'esecuzione di un'autopsia giudiziaria per accertare la causa di morte se è sorto il sospetto di reato, e in questo caso il medico legale, previa autorizzazione, potrà svolgere tutte le indagini necessarie per rispondere ai quesiti posti dal PM.

Nel contesto dell'autopsia molecolare i test genetici post-mortem nel deceduto sono comunicati all'Autorità Giudiziaria dal medico legale nell'ambito della consulenza tecnica.

Quanto sopra illustrato evidenzia come al centro di questa analisi è l'indagine autoptica. È dai risultati ottenuti che il medico legale o anatomo patologo possono indirizzare verso eventuali successive ulteriori indagini. Ad esempio, il riscontro macroscopico e istopatologico di l'identificazione di una cardiomiopatia (a base ereditaria) la valutazione dei familiari è fortemente consigliata. Di supporto allo studio autoptico è un'accurata valutazione della **storia clinica** del probando.

Per quanto riguarda l'**anamnesi familiare** è importante indagare non solo i casi di morte improvvisa (comprese le SIDS), ma anche quelli di scompenso cardiaco e/o trapianto cardiaco, che possono suggerire la presenza di una cardiopatia strutturale. È utile anche interrogare sulle circostanze di morti accidentali o per incidenti stradali per valutare se l'evento possa essere riconducibile ad una MCI o provocata da un episodio sincopale.

L'anamnesi viene accompagnata dalla compilazione di un albero genealogico che comprenda almeno 3 generazioni¹¹⁵; ciò consente di selezionare i membri della famiglia che necessitano dello screening cardiologico, e può fornire informazioni sulla modalità di trasmissione di una cardiopatia ereditaria e sul suo grado di penetranza nell'ambito di quella determinata famiglia¹¹⁶.

Grazie ai progressi ottenuti nella prevenzione e nella terapia delle malattie cardiovascolari in generale e delle aritmie cardiache in particolare, lo svolgimento di autopsie complete nei casi MCI è un tema di rilievo sia con risvolti clinico sia nella gestione della salute pubblica. Negli ultimi anni, è emerso come i defibrillatori impiantabili siano in grado di “prevenire” la morte improvvisa. Nel rendersi conto che non è possibile una strategia di prevenzione applicabile alla popolazione generale, è ragionevole ritenere che uno *screening*

¹¹⁵ Calcagnino, M., Crocamo, A. & Ardissino, D. La genetica per predire il rischio di morte improvvisa. (2016).

¹¹⁶ Autore, C. *et al.* Screening cardiologico delle famiglie con storia di morte improvvisa giovanile: quali patologie ricercare e con quali strumenti. **11**, 9 (2010).

mirato ai sottogruppi a maggior rischio come gli atleti, i giovani con sintomi cardiaci e le famiglie con storia di morte improvvisa possa essere applicato¹¹⁷.

I familiari delle vittime di MCI rappresentano, per l'appunto, un sottogruppo ad alto rischio su cui concentrare le strategie di prevenzione della morte improvvisa, attraverso un'accurata valutazione clinico-strumentale ed eventualmente genetica, che permetta la diagnosi tempestiva di cardiopatie subcliniche e quindi l'applicazione di algoritmi di stratificazione del rischio e di possibili terapie.

Poiché il modello di eredità autosomico dominante (AD) è il più comune per queste condizioni patologiche, le linee guida raccomandano lo screening clinico per i **parenti di primo grado** (figli, fratelli e genitori) di coloro che hanno una diagnosi clinica, poiché hanno una probabilità del 50% di ereditare la predisposizione aritmica^{118, 119}.

Screening genetico dei familiari del deceduto – consenso informato

I familiari non possono opporsi allo svolgimento di una autopsia giudiziaria,¹¹⁰ entrando in contrasto con le finalità di giustizia e il dovere legale di un pubblico ufficiale di assolvere il proprio compito.

Diversa è la questione dell'eventuale trasmissione dell'informazione ai famigliari della deceduta nel caso si sia rilevata una alterazione genica correlata a patologia a trasmissione familiare (alterazione genica costituzionale): questi soggetti, debitamente informati con procedura formale (consenso scritto alla notifica di risultati di esami medici che possono avere rilievo sui famigliari o congiunti del deceduto) del fatto che le eseguite indagini genetiche sul cadavere hanno prodotto informazioni che possono essere utili alla loro salute, possono rifiutare di riceverle. In questo caso è consigliabile fare firmare loro una dichiarazione specifica di rifiuto, in cui risulti chiaramente che: a) gli è stato proposto di conoscere informazioni genetiche relative a patologie di tipo familiare; b) che queste informazioni riguardano/non riguardano patologie per cui attualmente è disponibile una terapia¹²⁰.

Nella Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici viene definito screening genetico n. 8/2013, "il test genetico effettuato su popolazioni o su gruppi definiti, comprese le

¹¹⁷ Autore, C. *et al.* Screening cardiologico delle famiglie con storia di morte improvvisa giovanile: quali patologie ricercare e con quali strumenti. **11**, 9 (2010).

¹¹⁸ Spoonamore, K. G. & Ware, S. M. Genetic testing and genetic counseling in patients with sudden death risk due to heritable arrhythmias. *Heart Rhythm* **13**, 789–797 (2016).

¹¹⁹ Hellenthal N, Gaertner-Rommel A, Klauke B, Paluszkiwicz L, Stuhr M, Kerner T, Farr M, Püschel K, Milting H. Molecular autopsy of sudden unexplained deaths reveals genetic predispositions for cardiac diseases among young forensic cases. *Europace*. 2017 Nov 1;19(11):1881-1890. doi: 10.1093/europace/euw247. PubMed PMID: 29016939.

¹²⁰ <https://www.epicentro.iss.it/itoss/pdf/5%20marzo%202015/AnatomiaPatologica.pdf>

analisi familiari finalizzate a identificare -mediante "screening a cascata"- le persone potenzialmente a rischio di sviluppare la malattia genetica, al fine di delinearne le caratteristiche genetiche comuni o di identificare precocemente soggetti affetti o portatori di patologie genetiche o di altre caratteristiche ereditarie”.

Si legge inoltre che “con particolare riferimento alle patologie di natura genetica e tutela dell’identità genetica di un terzo appartenente alla stessa linea genetica dell’interessato con il consenso di quest’ultimo; nel caso in cui il consenso dell’interessato non sia prestato o non possa essere prestato per impossibilità fisica, per incapacità di agire o per incapacità d’intendere o di volere, nonché per effettiva irreperibilità, il trattamento può essere effettuato limitatamente a dati genetici disponibili qualora sia indispensabile per consentire al terzo di compiere una scelta riproduttiva consapevole o sia giustificato dalla necessità, per il terzo, di interventi di natura preventiva o terapeutica. Nel caso in cui l’interessato sia deceduto, il trattamento può comprendere anche dati genetici estrapolati dall’analisi dei campioni biologici della persona deceduta, sempre che sia indispensabile per consentire al terzo di compiere una scelta riproduttiva consapevole o sia giustificato dalla necessità, per il terzo, di interventi di natura preventiva o terapeutica”

La letteratura internazionale corrente identifica quattro modelli, riportati nella tabella sottostante¹²¹:

Modelli di consenso informato	Definizione
Consenso ampio	Permette l'uso dei campioni e dei dati loro associati in ricerche presenti e future di ogni tipo
Consenso parzialmente ristretto	Permette l'uso dei campioni e dei dati loro associati per una ricerca immediata specifica ed in investigazioni future associate direttamente od indirettamente a tali campioni
Consenso multi-opzione	Richiede molte opzioni che debbono essere spiegate al soggetto donatore in forma dettagliata
Consenso informato specifico	Permette l'uso dei campioni e dei dati loro associati solo per una ricerca specifica immediata, proibisce ogni studio futuro che non sia stato previsto al momento del consenso originario

¹²¹ Salvaterra E, Lecchi L, Giovanelli S, Butti B, Bardella MT, Bertazzi PA, Bosari S, Coggi G, Coviello DA, Lalatta F, Moggio M, Nosotti M, Zanella A, Rebulli P. Banking together. A unified mode1 of informed consent for biobanking. EMBO Rep. 2008; 9(4):307-13.

Il consenso informato necessario per l'esecuzione di test genetici sui parenti di primo grado di individui deceduti in cui il test genetico sia risultato positivo è obbligatorio⁹⁹ come stabilito peraltro dalla nuova legge italiana emanata nel 2017 sul consenso informato¹²².

Nella Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici 8/2013 si legge che per i trattamenti effettuati mediante test genetici, compreso lo screening, anche a fini di ricerca o di ricongiungimento familiare, deve essere acquisito il consenso informato dei soggetti cui viene prelevato il materiale biologico necessario all'esecuzione dell'analisi. In questi casi, all'interessato è richiesto di dichiarare se vuole conoscere o meno i risultati dell'esame o della ricerca, comprese eventuali notizie inattese che lo riguardano, qualora queste ultime rappresentino per l'interessato un beneficio concreto e diretto in termini di terapia o di prevenzione o di consapevolezza delle scelte riproduttive.

Per i bambini o altri individui che non siano in grado di prendere autonomamente le proprie decisioni mediche, gli esercenti la potestà genitoriale o i tutori legali devono assumersi la responsabilità decisionale. Nella scelta saranno aiutati da consulenti genetici o i professionisti sanitari qualificati con i quali discutere i pro e contro sull'esecuzione del test, rispondere alle domande e in caso ottenere il consenso.

Oggetto del consenso deve essere una descrizione del test genetico e il motivo per cui viene svolto. Deve essere precisata la tipologia di campioni biologici richiesti per le analisi.

Ottenuto il risultato del test, compresi risultati positivi e negativi, va precisata e la possibilità di risultati non informativi o di falsi positivi e falsi negativi; Deve essere spiegata la possibilità che i risultati possono fornire informazioni sullo stato di salute degli altri membri familiari, come il rischio di sviluppare una particolare patologia o la possibilità di avere figli affetti; Deve essere precisato a) l'esplicitazione analitica di tutte le specifiche finalità perseguite; b) i risultati conseguibili anche in relazione alle notizie inattese che possono essere conosciute per effetto del trattamento dei dati genetici; c) il diritto dell'interessato di opporsi al trattamento dei dati genetici per motivi legittimi; d) la facoltà o meno, per l'interessato, di limitare l'ambito di comunicazione dei dati genetici e il trasferimento dei campioni biologici, nonché l'eventuale utilizzo di questi per ulteriori scopi; e) il periodo di conservazione dei dati genetici e dei campioni biologici.

Come in ogni consenso informato deve essere data prova del fatto che la persona che ha che dovrebbe sottoporsi al test ha avuto l'opportunità di discutere con un operatore sanitario. Inoltre, l'aumento di nuove tecniche, ha sollevato il problema dei *reperti incidentali*, ovvero

¹²² Legge 22 dicembre 2017, n. 219, in materia di 'Consenso informato e disposizioni anticipate di trattamento'

risultati genetici non attesi e di incerto significato clinico. Pertanto, i pazienti devono essere informati di questa possibilità e dovrebbero esprimere la loro volontà di conoscere o meno il risultato.

I pazienti e i consulenti devono firmare il consenso informato; è importante ricordare ai pazienti che anche dopo aver firmato, possono ancora decidere di negare il consenso in qualsiasi momento. Il consenso è sempre revocabile¹²³.

Sebbene i test genetici possano apportare benefici grazie ad una diagnosi certa e ad una migliore conoscenza dei trattamenti preventivi e della stratificazione del rischio, essi possono anche contribuire a depressione, ansia, colpevolezza, discriminazione, conflitti familiari e uso inappropriato o non necessario di strategie per la riduzione del rischio.

I test genetici post-mortem sono in grado di identificare nei parenti biologici del deceduto mutazioni che potrebbero esporli a rischio di morte improvvisa. I vantaggi che potrebbero derivare dall'esecuzione di autopsia molecolare possono essere quindi trattamento precoce (anche mediante ICD) nei quali sia stata individuata una patologia aritmica non diagnosticata in precedenza^{124, 125}. Questa notizia potrebbe, in taluni individui, al contrario, avere risvolti negativi potrebbero consistere nella scoperta di una parentela erroneamente attribuita, preoccupazione e ansia per sé stessi o altri figli.

Nelle linee guida nazionali e internazionali, oltre alla importanza fondamentale di garantire che siano rispettati tutti i diritti individuali, inclusa l'autonomia della scelta di sottoporsi o non sottoporsi al test (e nel primo caso di conoscerne o meno il risultato), la libertà da pressioni da parte di terzi ed il più rigoroso rispetto della confidenzialità (OECD. 2007), viene inoltre sempre ribadito che il criterio essenziale per l'offerta di un test genetico, nel sistema della sanità pubblica, è quello della sua accertata validità scientifica e utilità clinica (arte dell'Additional protocol concerning genetic testing for health purposes del Consiglio d'Europa. 2008'). e che comunque la sua effettuazione può avvenire solo dopo aver ricevuto il consenso libero e pienamente informato della persona interessata.

I test genetici possono essere effettuati solo dopo che la persona sulla quale sono svolti abbia manifestato in forma scritta e sottoscritto il proprio consenso informato. Il consenso è informato solo dopo che la persona abbia ricevuto in modo adeguato tutte le informazioni

¹²³ Girolami, F. *et al.* Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *Journal of Cardiovascular Medicine* **19**, 1–11 (2018).

¹²⁴ McGuire, A. L. *et al.* The ethics of conducting molecular autopsies in cases of sudden death in the young. *Genome Res.* **26**, 1165–1169 (2016).

¹²⁵ Moore, Q. L., Majumder, M. A., Rutherford, L. K. & McGuire, A. L. Ethical and Legal Challenges Associated with Public Molecular Autopsies. *J Law Med Ethics* **44**, 309–318 (2016).

pertinenti e sia perciò messo in grado di comprendere i rischi, i benefici, i limiti e le implicazioni del test. I test genetici non possono essere effettuati sulle persone che non sono in grado di manifestare e sottoscrivere il consenso informato, salvo che l'indagine sia svolta nel loro interesse e con l'autorizzazione del rappresentante legale. I test che non siano di diretto interesse dei minori devono essere posticipati fino alla maggiore età, quando essi potranno esprimere autonomamente il proprio consenso. Documentazione dell'informazione ricevuta e testimonianza della consapevole determinazione positiva del soggetto a sottoporsi a un test è l'atto di consenso che segue alla consulenza genetica: questo deve riguardare anche le modalità di prelievo del campione ed i test che sullo stesso si intendono eseguire per lo scopo convenuto.

Sudden death: ethical and legal problems of genetic testing

Table 1. Genetic testing in cases of autopsy-negative sudden cardiac death: advantages (A) and disadvantages (D) of the options available to the geneticist^a

	Option 1 ^b	Option 2 ^c	Option 3 ^d
Confidentiality of the test result of the victim	A: not affected	D (worst): affected in all cases; all families will be given the test results	D (less damaging than option 2): affected in cases where the victim tests positive; relatives of these victims will be given the test results
Cost of testing	A: lowest cost, only one test	D: cost of testing of relatives depends on how many relatives accept testing	D: cost of testing of relatives depends on how many relatives accept testing
Cost of counselling	A: no cost because no counselling	D (worst): highest cost because of counselling for all family members	D (less costly than option 2); cost because of counselling for relatives of victims with positive test
Right not to know about family risk	Does not apply; relatives are not told	A: right not to know family risk is respected	D: right not to know family risk is NOT respected
Right not to know about one's own risk	Does not apply; relatives are not told	A: right not to know one's own risk is respected	A: right not to know one's own risk is respected
Duty to warn	D: relatives are not warned	A (best): all relatives are warned	A (second best): relatives of victims with positive test are warned
Anxiety of relatives about risks	A: relatives are not at risk of anxiety because they are not informed about any risk	D (worst): all relatives are informed and might become anxious about genetic risks and some 'unnecessary' anxiety is caused in those where the victim's test is negative	D (less damaging than option 2): relatives of victims with positive test are at risk of anxiety, but anxiety can be reduced if they undergo themselves genetic testing and test negative
Increase scientific knowledge/do not miss cases where the victim's mutation is not discovered ^e	A (third best): only testing of victims	A (best): depends on how many relatives accept testing, at least family history can probably be obtained from most relatives	A (second best): depends on how many relatives accept testing

^aA fourth alternative scenario has to be considered if genetic testing of post-mortem material is not feasible for technical reasons if the tissue is badly preserved and DNA analysis impossible; in this case, the question is whether to contact all relatives (option 2) or not.

^bGenetic testing of the sudden death victim within the mandate of an expert without any genetic counselling of relatives.

^cGenetic counselling of all family members before any genetic testing of the deceased relative is done.

^dOnly families of victims who have tested positive are contacted and counselled about the implications that the positive test has for their own risks.

^eSee Behr et al. (14).

Fig. 3 From “Elger BS, Michaud K, Fellmann F, Mangin P. Sudden death: ethical and legal problems of post-mortem forensic genetic testing for hereditary cardiac diseases”.

Il numero e il tipo di **indagini strumentali** necessari per un adeguato screening familiare dipendono dall'identificazione o meno di una cardiopatia strutturale nel probando e

nell'anamnesi nella famiglia. Le strategie di valutazione sono spesso rappresentate inizialmente da indagini meno invasive, ma poi se non si giunge ad una diagnosi, si passa ad esami più invasivi¹²⁶. Nello screening delle malattie cardiovascolari ereditarie, lo studio *ECG* (elettrocardiogramma) è fondamentale e rappresenta il primo livello di indagine, insieme all'ecocardiogramma, in quanto può mostrare anomalie di ripolarizzazione quali espressione di una cardiopatia sottostante. L'*ecocardiogramma* rappresenta l'esame di prima linea nello screening delle cardiopatie strutturali, mentre è di regola non patologico nelle canalopatie. Il *test ergometrico* è parte integrante dello screening cardiologico, principalmente per valutare l'induzione di aritmie da sforzo. L'*ECG Holter* consente di valutare la presenza di bradi- o tachiaritmie spontanee e anomalie di conduzione. La *ricerca dei potenziali tardivi* può rappresentare uno strumento utile nel sospetto di ARVC. La *RM cardiaca* è indicata principalmente nella diagnosi di ARVC. Infine, il *test provocativo con bloccanti dei canali del sodio* (principalmente con ajmalina che ha emivita più breve rispetto alla flecainide), può slatentizzare il pattern elettrocardiografico caratteristico della BrS.

Dall'insieme delle indagini cardiologiche si possono profilare tre scenari: diagnosi di malattia, sospetto diagnostico e cuore apparentemente normale. Nel primo caso deve essere effettuata un'adeguata stratificazione del rischio aritmico del soggetto affetto al fine di un'appropriata strategia di prevenzione della morte improvvisa. Nei casi sospetti o apparentemente normali, è comunque utile ricontrollare questi soggetti per un tempo che andrà valutato caso per caso sulla base della patologia sospettata: alcune malattie possono presentare una penetranza in rapporto all'età (ad esempio l'HCM), mentre altre, prive di substrato morfologico, possono manifestare una variabilità fenotipica spontanea nel tempo. Inoltre, nelle situazioni dubbie può essere utile estendere la valutazione cardiologica oltre i parenti di primo grado.¹¹⁴ In generale i soggetti adulti asintomatici sono seguiti fino all'età di 40 anni (periodo in cui la maggior parte delle malattie genetiche si sono espresse fenotipicamente) e possono essere assolti da tali controlli a patto che vengano comunicati immediatamente nuovi sintomi e nuove informazioni sulla famiglia¹²⁷.

¹²⁶ Priori, S. G. *et al.* HRS/EHRA/APQRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm* **10**, 1932–1963 (2013).

¹²⁷ Semsarian, C., Ingles, J. & Wilde, A. A. M. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European Heart Journal* **36**, 1290–1296 (2015).

“Incidental findings”

L’**analisi genetica** deve sempre essere accompagnata da un adeguato counselling i cui obiettivi principali sono rappresentati dalla spiegazione dei risultati dei test in un linguaggio comprensibile ai familiari, dall’identificazione di altri parenti a rischio, e dal fornire referenze per un follow-up se necessario¹²⁸. Il consulente genetista ha il ruolo di i soggetti interessati a prendere in piena autonomia le decisioni ritenute più adeguate, tenuto conto del rischio genetico, delle aspirazioni familiari e dei loro principi etico-religiosi, aiutandoli ad agire coerentemente con le scelte compiute, nonché a realizzare il miglior adattamento possibile alla malattia e/o al rischio di ricorrenza della malattia stessa¹²⁹. Nei casi in cui venga formulata una diagnosi genetica nel deceduto, i test genetici iniziali dovrebbero concentrarsi sui genitori per stabilire se la mutazione del gene sia stata ereditata, o se sia sorta *de novo* nel defunto. Nei casi di morte improvvisa in cui la mutazione identificata nel deceduto non sia risultata *de novo*, la principale utilità del risultato genetico è lo screening a cascata sui membri della famiglia a rischio. L’offerta di screening a cascata ai parenti asintomatici deve sempre essere eseguita insieme alla valutazione clinica e solo al fianco di una consulenza genetica completa pre e post test.

Il consenso informato per i test genetici eseguiti con NGS è complesso e presuppone considerazioni etiche: Creare consapevolezza del paziente su benefici e svantaggi tra cui il potenziale per l’ansia e l’incertezza esiste soprattutto per le varianti di significato sconosciuto. Inoltre va considerata la scoperta di risultati accidentali non correlati alla malattia in questione.

Mediante l’esecuzione di questi test si potrebbero scoprire molte cose che non si stavano cercando, per le quali non possiamo fare nulla. Alcuni sono banali o addirittura vantaggiosi, ma alcune potrebbero essere fonte di problemi e preoccupazioni e occasionalmente si potrebbero scoprire condizioni letali, non trattabili di esordio tardivo. Alcuni desiderano conoscere tali informazioni; altri no. E’ importante confrontarsi su come informare i pazienti su tali informazioni e consentire autonomia e scelta individuali.

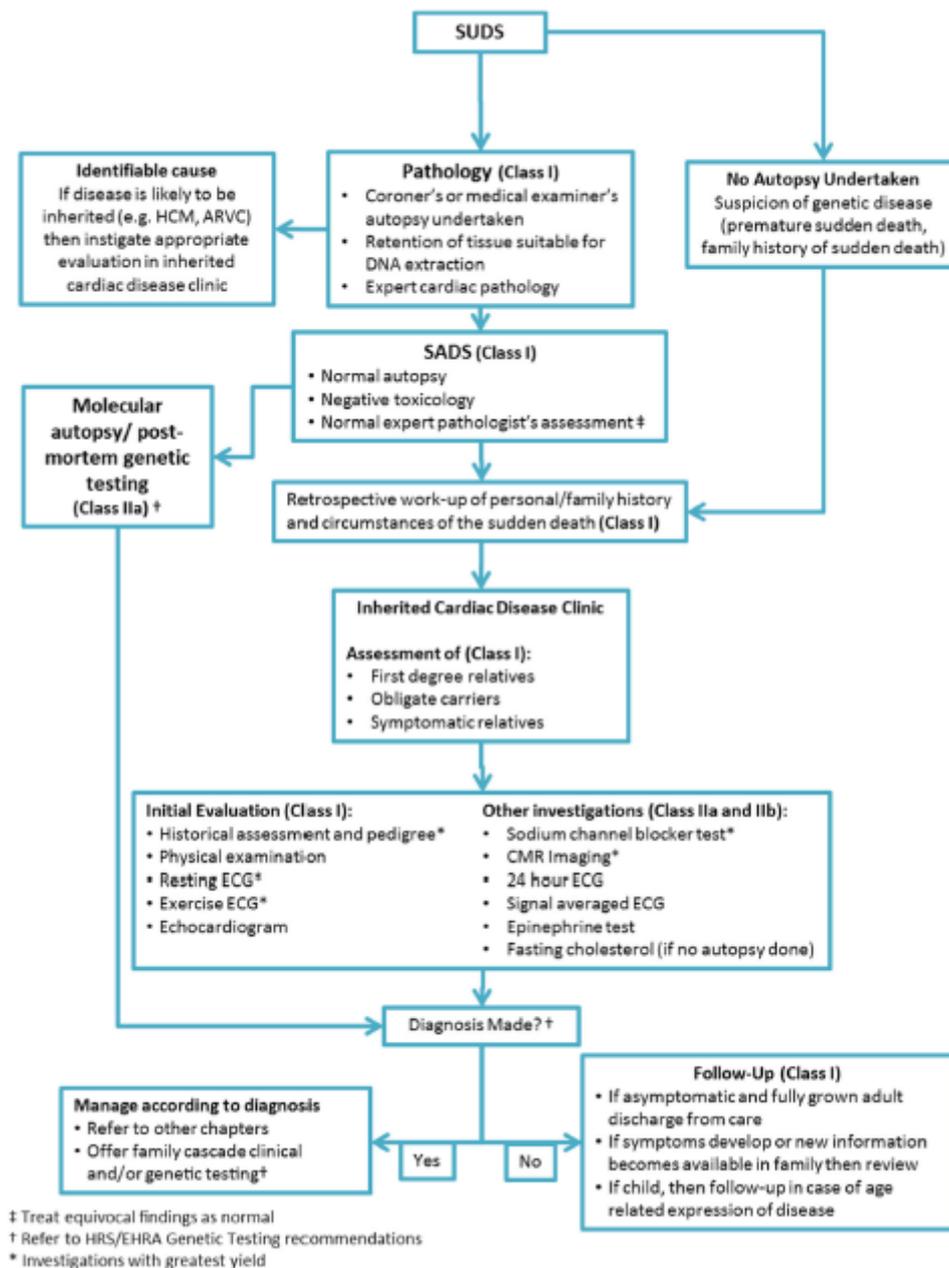
Dati di letteratura riportano che è ragionevole aspettarsi risultati accidentali di varia rilevanza clinica in tutti i soggetti testati, così come risultati falsi positivi e molti risultati difficili da interpretare o di significato clinico sconosciuto. Inoltre, il potenziale per i risultati accidentali aumenterà quasi certamente nel tempo man mano che verranno identificate più associazioni di malattie genetiche. Sorgeranno domande su quali “risultati incidentali” il laboratorio dovrebbe

¹²⁸ McGuire, A. L. *et al.* The ethics of conducting molecular autopsies in cases of sudden death in the young. *Genome Res.* **26**, 1165–1169 (2016).

¹²⁹ <https://www.garanteprivacy.it/web/guest/home/docweb/-/docweb-display/docweb/2818993>

riferire al medico ordinatore, come i clinici dovrebbero gestirle e, in particolare, quali per motivazioni dovrebbero essere utilizzate e quali risultanze dovrebbero essere divulgate al paziente¹³⁰.

Sebbene il tema dei risultati incidentali sia stato oggetto di accesi dibattiti in ambito di ricerca, la considerazione di questi problemi in ambito clinico è solo all'inizio.¹³¹



¹³⁰ Elger BS, Michaud K, Fellmann F, Mangin P. Sudden death: ethical and legal problems of post-mortem forensic genetic testing for hereditary cardiac diseases. Clin Genet. 2010 Mar;77(3):287-92. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01293.x. Epub 2009 Oct 23. PubMed PMID: 19863545.

¹³¹ Wolf SM, Lawrenz FP, Nelson CA, et al. Managing incidental findings in human subjects research: analysis and recommendations. J Law Med Ethics. 2008 Summer;36(2):219-48. 211

Fig.4: Flow chart per l'identificazione per patologie cardiache ereditarie in famiglie che hanno sofferto un evento di MCI inspiegata. Da HRS/EHRA/APHRs Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes: Heart Rhythm, Priori, S. G. et al. (2013).

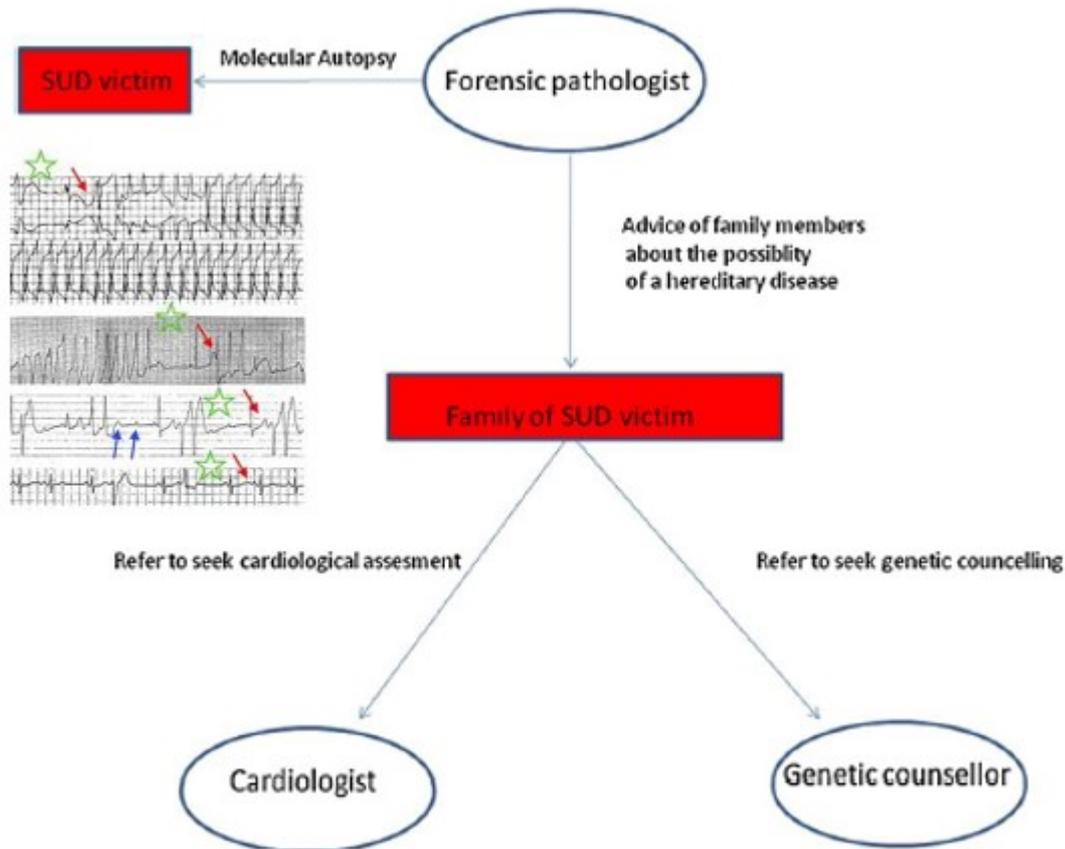


Fig.4 bis: Flow chart di un approccio multidisciplinare nei casi di MCI

Table 1. Active Disclosure of Cancer Genetic Risk Information to At-Risk Relatives of Deceased Participants in NGS Studies: Advantages and Disadvantages	
Advantages	Disadvantages
Decreased psychological burden for patient and family	Potential psychological harm to at-risk relatives
Greater engagement of at-risk relatives in prevention and surveillance programs	Potential violation of at-risk relatives' right not to know, autonomy and privacy
Greater accuracy of information conveyed to at-risk relatives	Strain on scarce research resources
Fulfillment of researchers' ethical duties and legal obligations (depending on jurisdiction)	Stretching of researchers' duties toward research participants' families

Abbreviation: NGS, next-generation sequencing. Adapted.¹²

Tabella 2 from: Battistuzzi L, Ciliberti R, Bruno W, Turchetti D, Varesco L, De Stefano F. Communication of clinically useful next-generation sequencing results to at-risk relatives of deceased research participants: toward active disclosure?

3 Capitolo

Approccio Multidisciplinare nei casi di MCI

Ruolo della medicina legale all'interno del “Progetto Morte Improvvisa giovanile” Emilia – Romagna

3.1 Background e obiettivo dello studio:

La MCI costituisce un evento estremamente tragico indipendentemente dall'età delle vittime e dalla circostanza in cui questa si verifica, ma è probabilmente di maggior impatto e più drammatica quando colpisce bambini e giovani adulti, ovvero individui non soggetti a fattori di rischio cardiovascolari gravati dall'età e che generalmente, nell'ideale collettivo, sono associati ad un buon stato di salute¹³².

Come già sottolineato, l'autopsia gioca un ruolo chiave nella diagnosi delle cause cardiache o extra-cardiache della morte e nel definire la natura delle patologie cardiache implicate e il meccanismo aritmico o meccanico della morte cardiaca. Sulla base dei reperti riscontrati all'autopsia, è possibile anche definire gli ulteriori passi necessari al processo diagnostico.

Il processo diagnostico per la definizione della causa della MCI è spesso complesso e pertanto, le linee guida in materia sostengono fortemente la necessità di creare una rete **multidisciplinare** di esperti che agisca nei casi di MCI, al fine *in primis* di migliorare la diagnosi di morte e poi per mettere in atto, in caso di anomalie genetiche, un counselling genetico adeguato e organizzare strategie preventive per i familiari. Tale rete dovrebbe includere cardiologi, anatomopatologi, medici legali, genetisti in collaborazione con microbiologi, tossicologi^{3,67}

L'identificazione di una patologia cardiaca ereditaria rappresenta inoltre, come già menzionato, la premessa per poter pianificare una consulenza cardiologica e genetica multidisciplinare per i parenti prossimi delle vittime di MCI.

Oggi il pensiero europeo è concorde su questa linea e sono stati prodotti numerosi documenti e gruppi di lavoro: nel 2015 “Swiss Society of Legal Medicine” ha creato un gruppo

¹³² Emery, M. S. & Kovacs, R. J. Sudden Cardiac Death in Athletes. *JACC: Heart Failure* **6**, 30–40 (2018).

di lavoro multidisciplinare con clinici, genetisti molecolari e cardiologi, con il fine di rendere omogeneo e armonizzare l'approccio di indagine alla MCI sia da un punto di vista autoptico sia per le indagini successive; anche le attuali Linee Guida Europee proposte dalla AECPV (Association for European Cardiovascular Pathology) evidenziano la necessità di un percorso standardizzato e omogeneo nei casi di MCI consistenti in: esecuzione di un'autopsia giudiziaria a tutte le vittime di MCI al di sotto dei 40 anni (attualmente spostato a 45); il prelievo e la conservazione di un numero adeguato di campioni per i test genetici; comunicazione con le famiglie e un approccio multidisciplinare che comprenda il counselling genetico.⁹¹ Le raccomandazioni proposte dal "Sudden Cardiac Death Working Group", sono poi state aggiornate nel 2017 ponendo maggior attenzione al test e counselling genetico¹³³. Anche negli Stati Uniti, programmi come il Registro della "Sudden Death in the Young" dei National Institutes of Health e dei Centri statunitensi per il controllo e la prevenzione delle malattie prevedono la collaborazione multidisciplinare tra esperti e la possibilità di collaborare con l'Associazione nazionale dei "Medical Examiner"

L'approccio multidisciplinare sul caso non si ferma solo alla parte autoptica in merito alle cause di morte ma comprende l'assistenza clinica cardiovascolare, la valutazione genetica con annessa prescrizione di test genetici, interpretazione dei risultati e comunicazione delle informazioni ai familiari sopravvissuti, e la valutazione del benessere psicosociale delle famiglie durante il percorso.

Progetti specifici per la MCI sono carenti in Emilia-Romagna e in Italia in generale: è spesso difficile stimare il numero stesso dei casi sottoposti ad autopsia, perché non esistono archivi condivisi.

La mancanza di reti collaborative condivise e di database comuni rende difficile ottenere dati precisi. Per le autopsie forensi di MCI non esiste, attualmente, un archivio condiviso, né nell'area metropolitana di Bologna e nemmeno nella regione Emilia-Romagna. Non è possibile, quindi, disporre di dati attendibili sulle cause di Morte Improvvisa o sul numero stesso dei casi occorsi. La situazione è analoga per i casi di MCI sottoposti ad autopsia nei vari ospedali dell'area metropolitana di Bologna o dell'Emilia-Romagna.

Per quanto riguarda i riscontri diagnostici eseguiti presso l'Ospedale Sant'Orsola, nonostante la disponibilità di un sistema di refertazione computerizzato, rimane comunque difficoltoso raccogliere dati omogenei sulla MCI per la mancanza di report patologici

¹³³ Argelia, M.-D. *et al.* Recommendations for genetic testing and counselling after sudden cardiac death: practical aspects for Swiss practice. *Swiss Medical Weekly* (2018)

standardizzati, sia relativamente alla raccolta di dati clinici che delle diagnosi patologiche conclusive.

Inoltre, purtroppo, negli ultimi anni si è assistito a un progressivo decremento nel numero di autopsie sia esse cliniche che giudiziarie con ovvie ripercussioni sulla stima di una reale incidenza di MCI.

Negli ultimi decenni, l'interesse da parte della comunità scientifica su sulla MCI si è accresciuto enormemente. Le nuove conoscenze in ambito genetico hanno consentito non solo di individuare cause di MCI prima inspiegate, ma anche di valutare il rischio che i correlati delle vittime hanno di incorrere nella stessa sorte infausta. Inoltre, oggi vi è la possibilità di realizzare una prevenzione primaria efficace mediante l'impianto di un defibrillatore cardiaco impiantabile (ICD) sui soggetti asintomatici ma a rischio di sviluppare aritmie fatali, individuati allo screening genetico; la disponibilità di un trattamento valido, ha quindi reso ancora più indispensabile il raggiungimento di una diagnosi precoce, in quanto oggi è realmente possibile cambiare la storia naturale della malattia.

In linea con questa tendenza internazionale, nel 2017 è stato avviato a Bologna il progetto "Morte improvvisa giovanile" Fondazione Fanti Melloni -UNIBO (Fig.14), con l'intento di diagnosticare e prevenire casi di morte improvvisa inspiegata, specialmente di origine cardiaca, nei giovani. Il progetto è finanziato dalla Fondazione Fanti Melloni, una fondazione non a scopo di lucro, nata da un lascito privato nel 2003 con il compito di sostenere la ricerca nel campo della cardiologia. L'idea del progetto è avvenuta dopo il caso di un 46enne deceduto durante una partita di tennis; è stato eseguito accertamento autoptico con esami istopatologici che non hanno permesso di rilevare alterazioni macroscopiche; sono quindi stati eseguiti ulteriori accertamenti di natura genetica dai quali è emersa una mutazione genetica causativa. Mediante l'esecuzione di uno screening genetico esteso ai familiari di primo grado, è stato possibile riscontrare la stessa mutazione nel figlio, al quale si è provveduto ad impiantare un defibrillatore automatico, che dovrebbe prevenire lo sviluppo di eventi avversi futuri nel soggetto.

"HIC MORS GAUDET SUCCURERE VITAE", ovvero *"in questo luogo la morte si compiace di prestare soccorso alla vita"*, è l'iscrizione presente in tutte le sale anatomiche italiane e rappresenta lo slogan di questo progetto. Al suo interno mostra l'obiettivo primario che questo si propone di conseguire: far sì che le conoscenze ottenute in sala autoptica sulla "morte", ovvero i soggetti deceduti per MCI, siano poste al servizio della "vita", ossia il gruppo biologico di appartenenza delle vittime sulle quali sarà possibile svolgere prevenzione e follow-up adeguati.

In questo contesto la Medicina Legale Universitaria di Bologna è stata parte del progetto con casi di pertinenza forense e richiesti dall'autorità giudiziaria e lavorando in stretta sinergia con la parte clinica. Infatti, a causa della modalità del decesso, le MCI si verificano più frequentemente fuori dall'ospedale e le autopsie sono quasi invariabilmente eseguite da patologi forensi. Infatti nella maggior parte dei casi di decessi improvvisi e imprevisti, soprattutto se la vittima è giovane. L'autopsia è richiesta con il fine di escludere l'omicidio o il suicidio come causa di morte

Hanno aderito al progetto tutte le principali città della regione (Bologna, Cesena, Ferrara, Forlì, Imola, Modena, Parma, Ravenna, Reggio-Emilia, Rimini e Piacenza), anche se con diversi livelli di adesione da parte dei singoli centri; inoltre, è stata fondamentale la partecipazione e collaborazione dell'Autorità Giudiziaria.

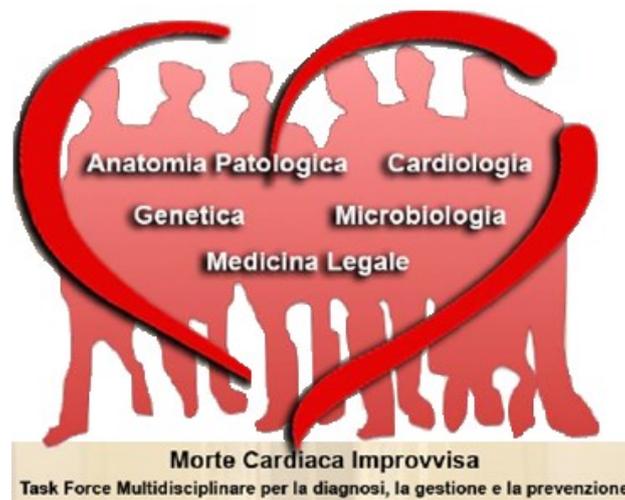


Fig.5: Progetto “Morte improvvisa giovanile”, Fondazione Fanti-Melloni - Unibo; diagnosi e prevenzione della morte cardiaca improvvisa in Emilia-Romagna.

Gli obiettivi che questo progetto si impegna a perseguire sono i seguenti:

- Rendere operativa una rete multidisciplinare per la diagnosi, gestione e prevenzione della MCI giovanile, in collaborazione stabile con le Autorità Giudiziarie;
- Standardizzare e condividere procedure e protocolli diagnostici in accordo con le linee guida internazionali;
- Predisporre collegamenti tra i patologi ospedalieri, i medici-legali che operano nel territorio e le cardiologie regionali;
- Definire lo spettro eziologico della MCI;
- Individuare patologie cardiache genetiche potenzialmente ereditarie e definire il contributo dell'analisi genetica post-mortem;

- Individuare forme precliniche delle patologie nei familiari di I grado dei soggetti deceduti, nei quali mettere in atto un corretto follow-up clinico-strumentale;
- Costruire un Registro Regionale delle Morti Improvvise giovanili, comprensivo di dati autoptici, clinici, molecolari e genetici.

Il risultato atteso è quello di ridurre i casi in cui non sia possibile risalire a una causa di morte (SUD) e, una volta definite eventuali patologie genetiche responsabili del decesso, offrire supporto alle famiglie colpite da questi eventi, incoraggiare una valutazione cardiologica dei parenti presso i Centri di riferimento per la morte improvvisa e promuovere assetti organizzativi adeguati.

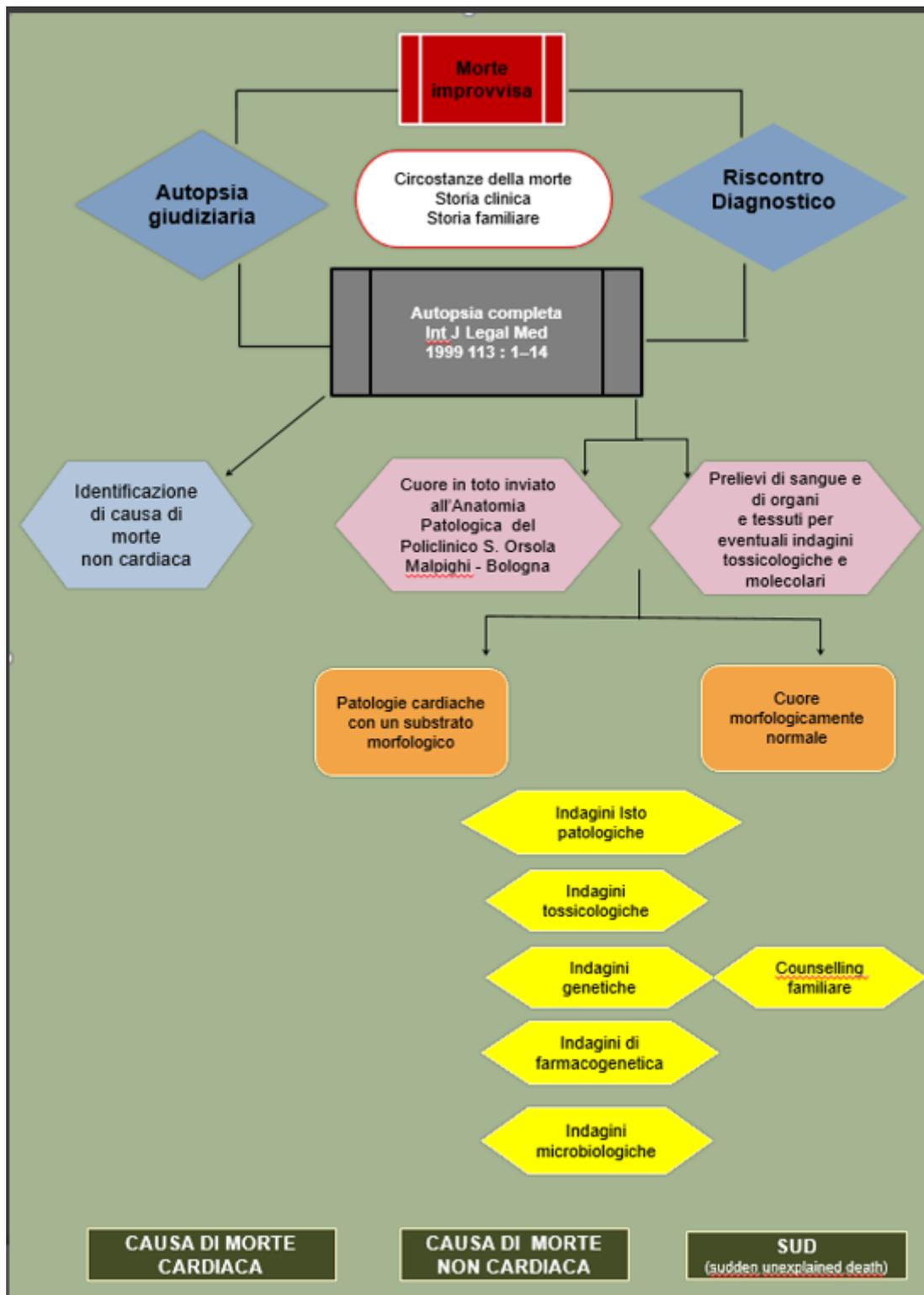


Fig.6: Flow chart Percorso MCI

3.2 Materiali e metodi

Nel presente studio sono riportati e analizzati i casi di MCI in soggetti <51 anni individuati nelle autopsie giudiziarie condotte a Bologna tra l'agosto 2018 e maggio 2019.

Oltre che dalle autopsie giudiziarie provenienti dall'istituto di Medicina Legale di Bologna per il Progetto Morte Improvvisa giovanile i campioni provengono da altri istituti di medicina legale della Regione dai riscontri diagnostici eseguiti dall'anatomia Patologica per finalità cliniche, e dalla Banca dei Tessuti Cardiovascolari.

Sono stati inclusi nella casistica i soggetti con un'età compresa tra 1 anno e 51 anni, seguendo i criteri di inclusione proposti dal progetto "Morte improvvisa giovanile" che, dopo l'iter di preparazione e approvazione, ha preso il via ad agosto 2018. Sono stati, invece, esclusi casi con causa di morte non cardiaca diagnostica all'autopsia, neonati <1 anno, pazienti con malattie terminali in cui la morte era ragionevolmente prevedibile entro 6 mesi, o trattandosi di autopsie richieste dall'Autorità giudiziaria, i casi in cui i fattori esterni violenti sono stati l'unica causa della morte. Sono stati esclusi casi di Morte Improvvisa Giovanile in cui i dati circostanziali e l'anamnesi del soggetto lasciavano con elevata probabilità ritenere che si trattasse di un decesso non correlabile a eventi naturali ma a intossicazione da xenobiotici.

Per ciascun caso sono stati valutati età, sesso, se note le circostanze di morte e qualora fossero disponibili, dati anamnestici rilevanti.

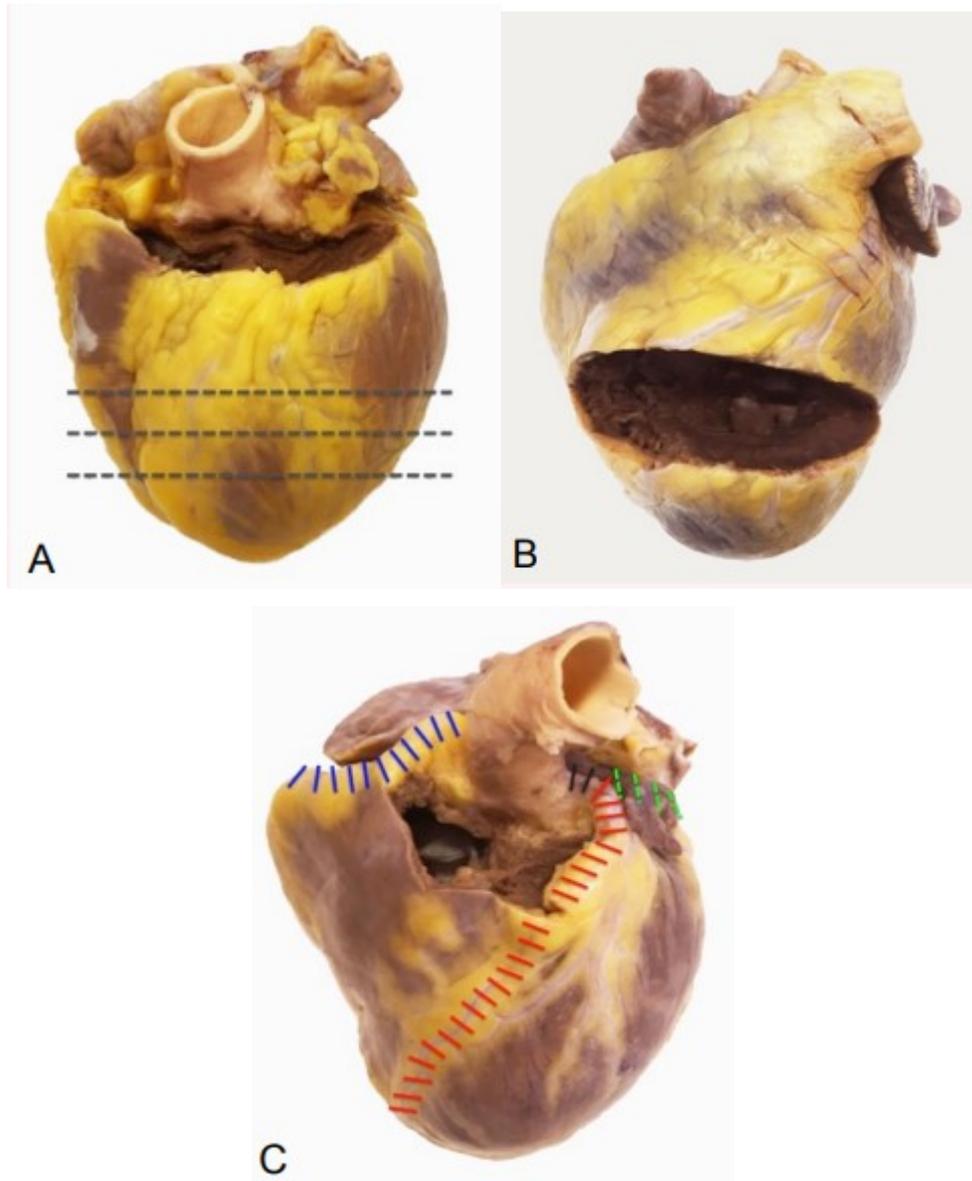
Le autopsie sono state eseguite in accordo con le linee guida autoptiche AECVP per l'indagine della MCI del 2017, nelle quali è fondamentale che la diagnosi sia raggiunta attraverso un attento processo di esclusione: prima si sono escluse le cause extra-cardiache di morte improvvisa e in seguito si è valutato il possibile coinvolgimento cardiaco.

Come indicato nelle linee guida per autopsia nei casi di MCI il cuore è stato prelevato in toto e indirizzato in formalina tamponata al 10% al Centro specializzato di Patologia Cardiovascolare del Policlinico Sant'Orsola.

L'esame cardiopatologico è stato condotto secondo le Linee guida dell'Associazione Europea per la Patologia Cardiovascolare per l'analisi della MCI.

Le linee guida suggeriscono di effettuare da 1 a 3 sezioni parallele di 1 cm circa di spessore lungo l'asse trasversale del cuore, a partire dall'apice (Foto A), senza discontinuare l'organo (Foto B). Porre un paio di garze imbevute di formalina nelle cavità ventricolari

Per esame delle coronarie: effettuare, nei rami subepicardici maggiori, tagli paralleli alla distanza di 3 mm l'uno dall'altro lungo l'asse trasversale delle arterie (Foto C)



Dei casi selezionati, è stata quindi eseguita un'autopsia completa con approccio sequenziale, accompagnata da adeguate indagini istologiche, tossicologiche ed eventualmente microbiologiche, e nel caso in cui queste fossero risultate tutte negative, dall'esecuzione di opportuni test genetici.

È stato utilizzato un protocollo prelievi da eseguire in sede autoptica per indagini genetiche ed eventualmente farmacogenetiche, per indagini microbiologiche, per indagini tossicologiche e per ulteriori indagini ultrastrutturali consistente in:

Prelievi per indagini genetiche (ed eventualmente farmacogenetiche) (da conservare a -40 °C o -80 °C)

- sangue venoso periferico in provetta con EDTA: 6 ml (se non disponibile, prelevare sangue da altre sedi).
- biopsia cutanea/splenica e biopsia miocardica per l'estrazione di DNA e RNA NB: I tessuti inclusi in paraffina non sono ottimali, ma possono essere utilizzati in mancanza di altri prelievi.

Prelievi per indagini microbiologiche (da conservare a -40 °C o -80 °C)

- sangue venoso periferico in provetta con EDTA: volume minimo di 1 ml
- due biopsie miocardiche del diametro di 2-3 mm, ciascuna in provette eppendorf senza fissativo.

Prelievi per indagini tossicologiche quantitative (da conservare a -20 °C)

- sangue venoso periferico: 10-20 ml
- sangue prelevato dalle cavità cardiache: 25 ml
- urine: 10-20 ml § bile: tutta/20 ml (quando non disponibile l'urina)
- contenuto gastrico
- umore vitreo: 5-10 ml § una ciocca di capelli (0.2 gr) o peli pubici (se non disponibili i capelli)
- campioni tissutali (miocardio, fegato, polmone, rene, grasso sottocutaneo, muscolo scheletrico): 25-50 gr

Prelievi per indagini ultrastrutturali

Nel sospetto di patologie mitocondriali, da accumulo o infiltrative, campioni di miocardio o di altri tessuti (0.5-1 cm) da fissare in glutaraldeide al 2.5% a temperatura ambiente.

Sono stati prelevati, inoltre, 5g di tessuto (milza, fegato e cuore) da utilizzare nel caso in cui ulteriori indagini genetiche fossero necessarie. L'autopsia molecolare è stata eseguita mediante le nuove tecniche della Next Generation Sequencing con tecnologia Ion Torrent, e qualora fossero state identificate mutazioni o varianti di rilievo nel genoma della vittima, la conferma è stata ottenuta tramite amplificazione con PCR e sequenziamento con metodo Sanger.

Sono disponibili diversi pannelli NGS per i test genetici, e la scelta relativa a quale di questi applicare nell'autopsia molecolare è dipesa dai risultati ottenuti nella valutazione dei reperti autoptici e dei dati anamnestici. Il pannello utilizzato in questi casi è stato NGS ARITMIE, in grado di valutare simultaneamente 38 geni (*AKAP9, ABCC9, ANK2, CACNA2D1, CACNB2, CALM1, CALM2, CASQ2, CAV3, DES, DSG2, DSP, GJA5, GPD1L, KCNQ1, LMNA, JUP,*

KCNA5, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, NPPB, MYH6, PKP2, RYR2, SLMAP, SCN10A, SCN1B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, AKAP10, TNNT2, TRPM4, SNTA).

In caso di positività dei test genetici, è stato attuato uno screening clinico e/o genetico sui familiari di primo grado delle vittime. In ambito genetico è stata ricercata la stessa mutazione riscontrata nel probando, mentre sul piano clinico sono stati eseguiti ECG basali e da sforzo, ed inoltre accertamenti ecocardiografici come ulteriore livello d'indagine.

Il progetto prevede differenti possibili livelli di adesione da parte dei singoli centri:

- Livello 1: “semplice” immissione dei dati del Centro nel Registro Regionale dopo un percorso diagnostico completato localmente.
- Livello 2: consultazione reciproca fra il Centro e Bologna con scambio documentale, condivisione della necessità/opportunità di ulteriori indagini diagnostiche e immissione dei dati nel Registro Regionale.
- Livello 3: invio del cuore all'Unità di Patologia Cardiovascolare del Policlinico di Sant'Orsola Malpighi di Bologna con consultazione sulla diagnosi patologica conclusiva e valutazione della necessità/opportunità di svolgere ulteriori indagini diagnostiche. Immissione dei dati nel Registro Regionale.

Nota: l'accesso all'analisi genetica presso la Genetica Medica del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi è previsto per i livelli 2 e 3.

Screening clinico e strumentale dei familiari di I grado

A giudizio del Centro in cui si è verificato il decesso:

- da condurre autonomamente
- da condurre in collaborazione con Bologna Follow-up di parenti eventualmente affetti o a rischio

A giudizio del Centro in cui si è verificato il decesso:

- da condurre autonomamente
- da condurre in collaborazione con Bologna.

Tutti i costi sono sostenuti dalla Fondazione Melloni nell'ambito del progetto-

3.3 Risultati

Il numero dei casi inseriti nel Progetto Morte Improvvisa giovanile da agosto 2018 fino a maggio 2019 è stato 29.

Del totale, 19 casi provenivano dalla Medicina Legale, 6 casi dalla Banca dei tessuti cardiovascolari e 4 casi dall'Anatomia Patologica. Dei 19 casi Medico Legali, 12 provenivano dalla casistica del settore Bolognese dell'Università di Bologna (Fig. 4).

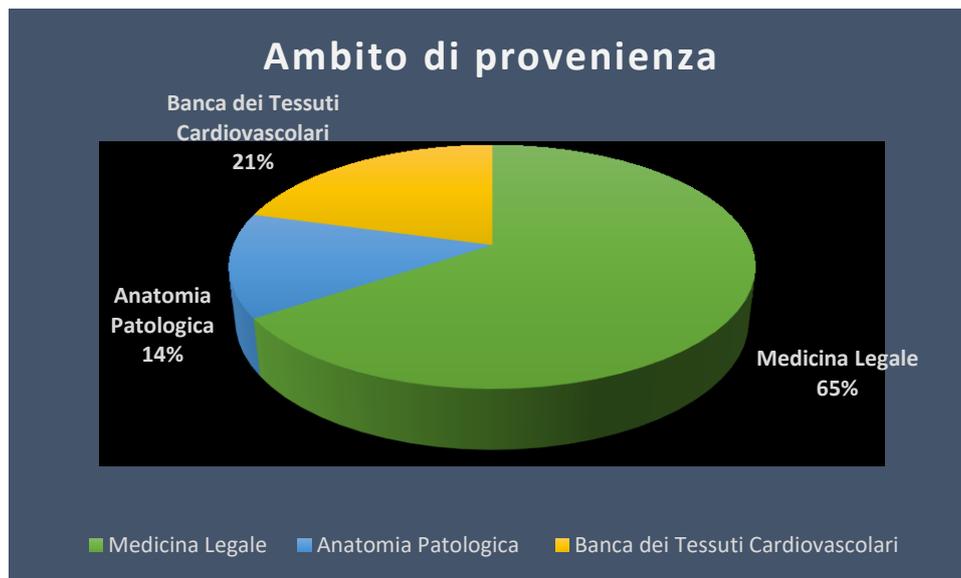


Fig. 7 Ambito di provenienza dei casi inseriti nel Progetto

Le autopsie giudiziarie svolte a Bologna tra Agosto 2018 e Maggio 2019 sono state 122; di queste, 12 casi (cioè il 9.8% del totale) presentavano le caratteristiche di MCI giovanile ed erano idonee a essere introdotte nel Progetto Morte Improvvisa giovanile – Emilia-Romagna.

Considerando la totalità dei casi forensi, dei 19 casi, il campione era costituito per il 17 soggetti di genere maschile, 3 di genere femminile (Fig.5).

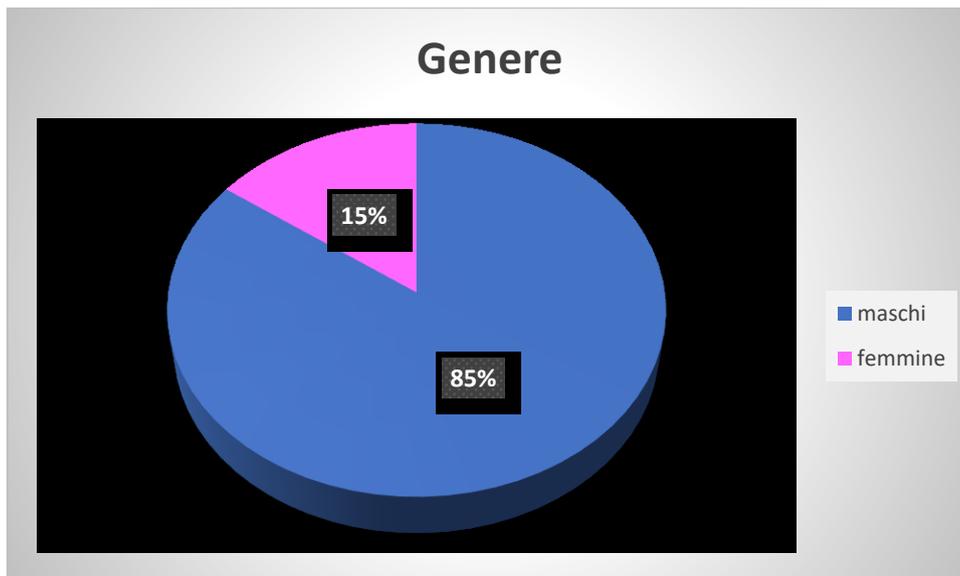


Fig. 8 Genere

L'età media del campione è pari a 32,31 anni range 1 – 51).

Dati anamnestici

Ove possibile si è cercato di ottenere dati anamnestici in ambito cardiologico e non cardiologico. Nel 63% dei casi l'anamnesi cardiologica è risultata negativa. (Fig. 6-7). Nei casi in cui era positiva sono stati riferiti pregressi episodi lipotimici, note extrasistoli, un sospetto di Sindrome di Brugada e in un caso era previsto un accertamento cardiologico il giorno dopo il decesso.

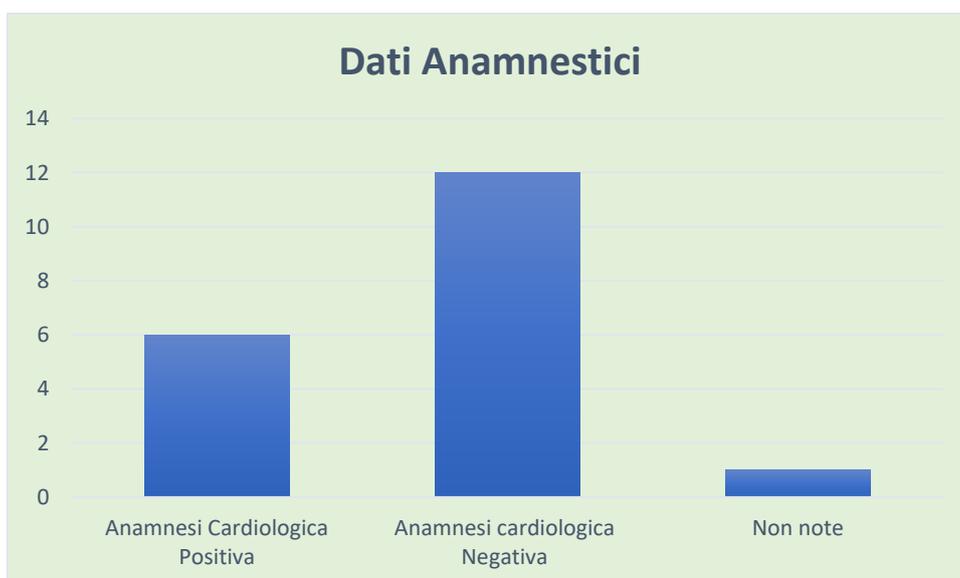


Fig. 10 Dati anamnestici

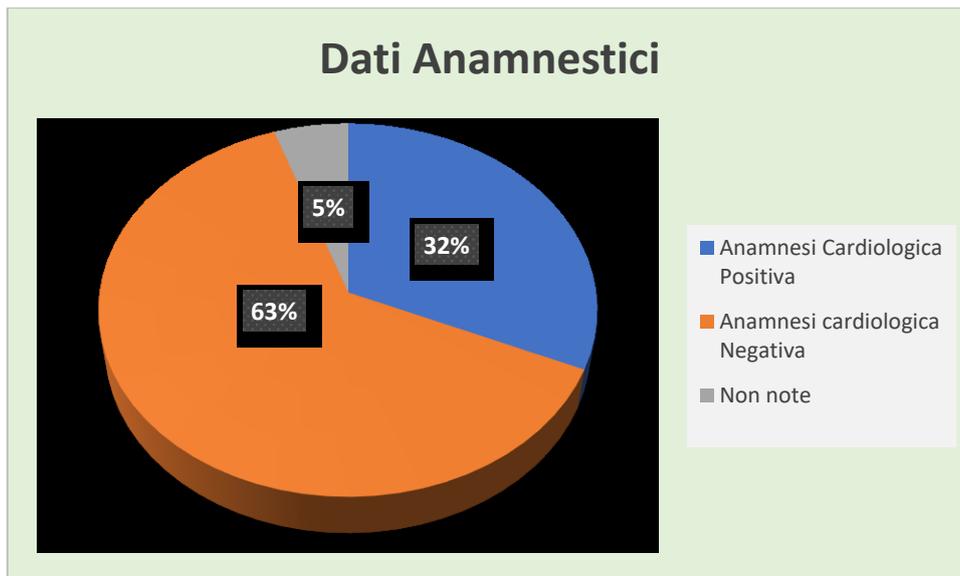


Fig. 9 Dati anamnestici

Modalità del decesso:

Alla luce della nota relazione tra modalità del decesso e alcune canalopatie, si sono cercate informazioni sulle modalità del decesso. La maggior parte dei casi di MCI (47%) si sono verificati durante il sonno (il corpo è stato rinvenuto al mattino, a letto), il 29% mentre il soggetto era a riposo (al domicilio). La nostra casistica ha rilevato solo 1 caso di MCI durante attività sportiva. (Fig. 8-9).

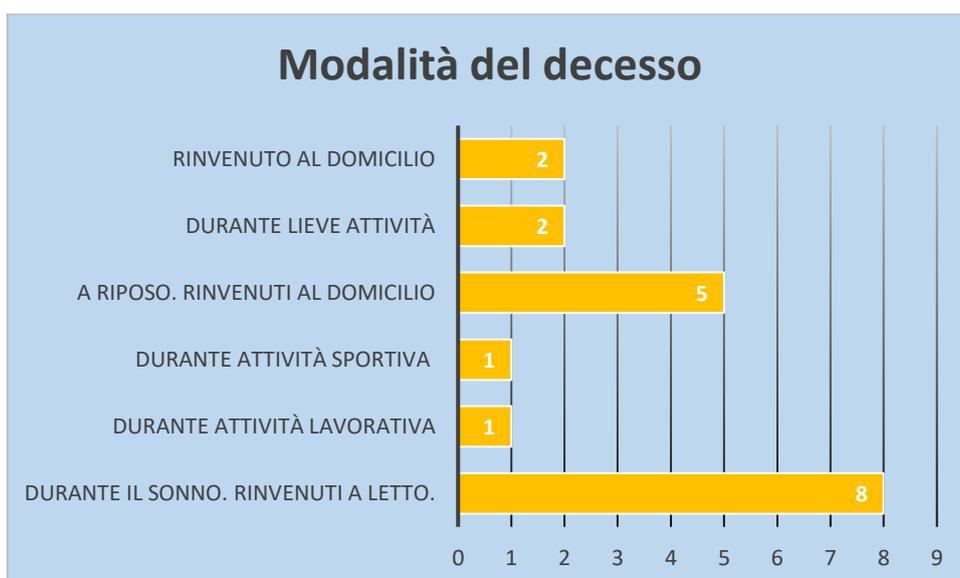


Fig. 11 Attività svolta al momento del decesso

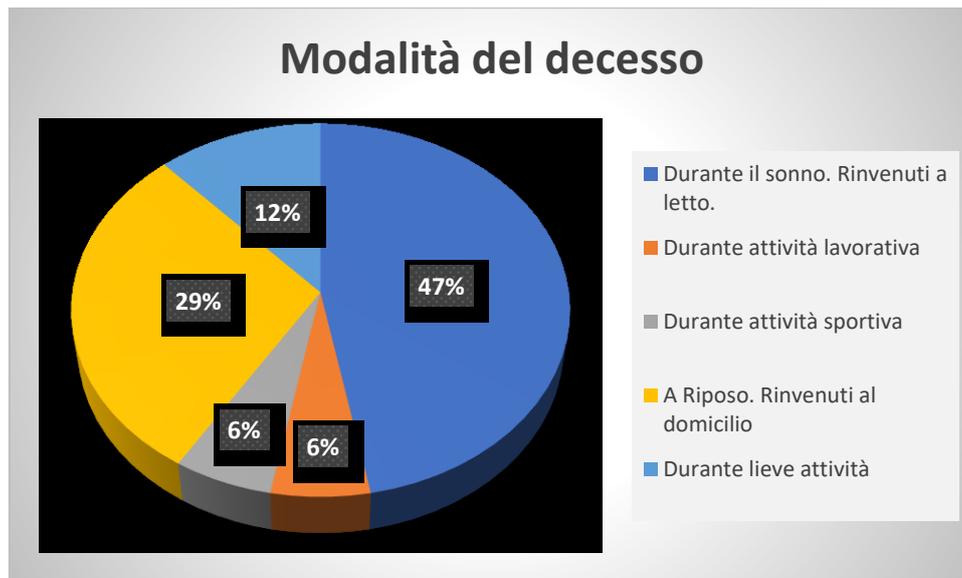


Fig.12: Attività svolta al momento del decesso

Nella casistica Medico Legale la principale causa di morte riscontrata è stata ascrivibile al gruppo delle canalopatie (21%), seguita dalle Malattie Infiammatorie del Miocardio (16%) e della Cardiomiopatia Dilatativa (16%) (Fig. 10).

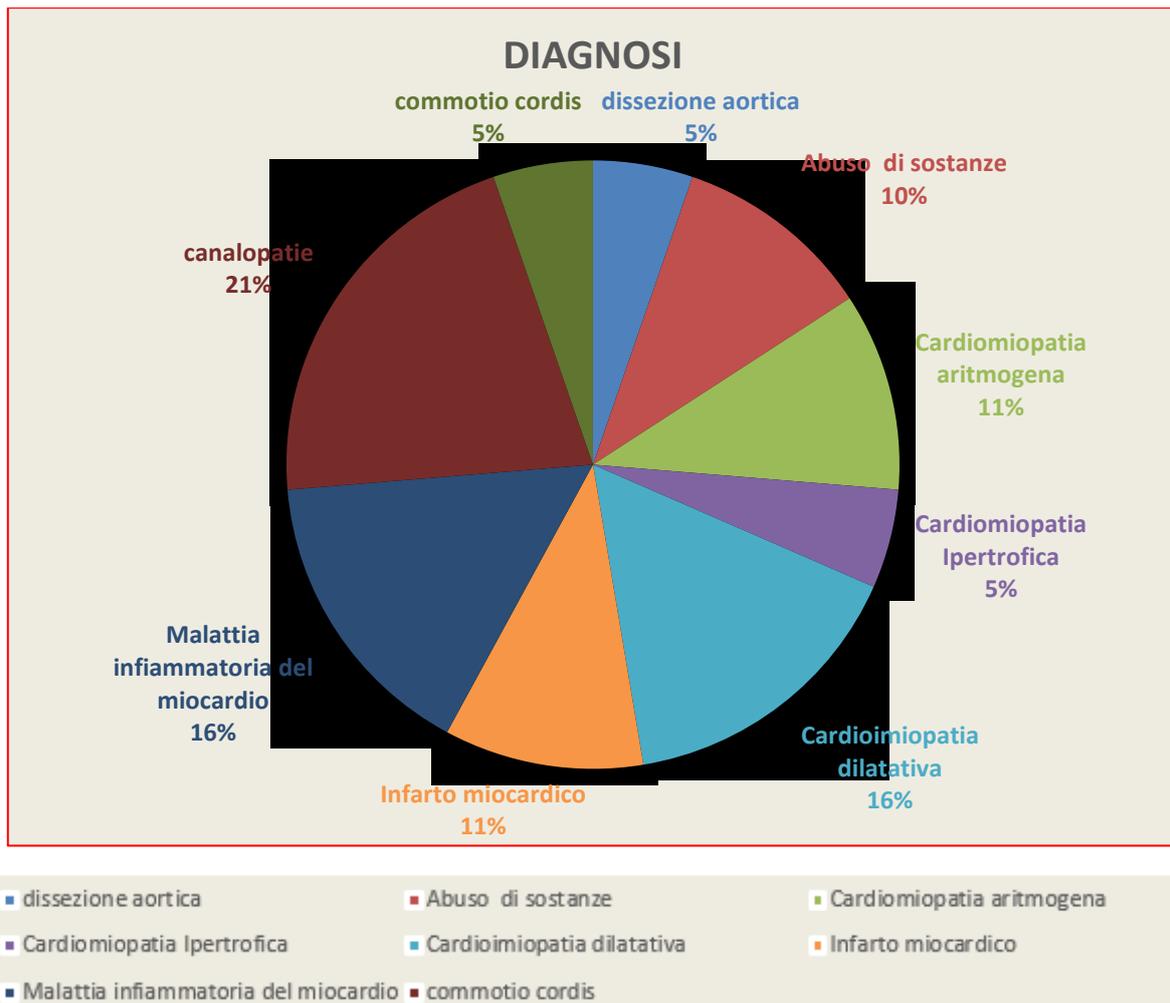


Fig.13: Diagnosi

Le patologie miocardiche infiammatorie erano sarcoidosi cardiaca (1 caso), miocardite virale (1 caso) e miocardite eosinofila necrotizzante (1 caso), estremamente raro in letteratura.

Un solo caso riguarda uno sportivo, in particolare un calciatore, e la causa di morte individuata è stata la HCM, patologia indicata dalla letteratura internazionale come principale causa di MCI negli atleti.¹¹⁹

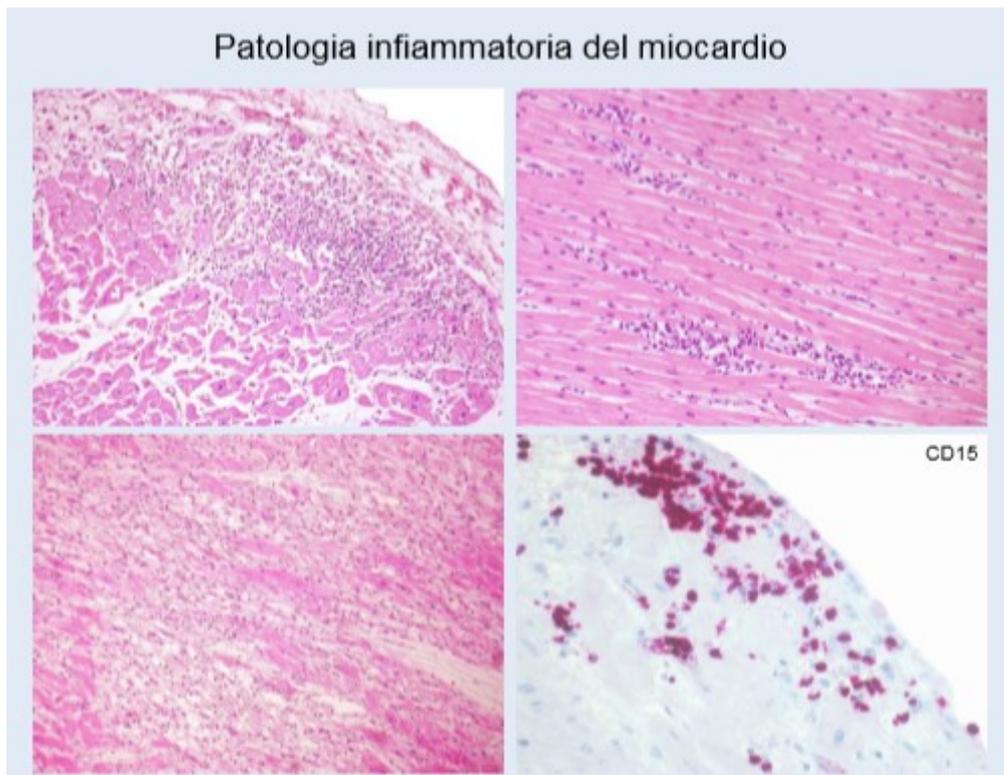


Fig.14: Miocardite Eosinofila Necrotizzante

Sarcoidosi cardiaca

Uomo di 44 anni deceduto a riposo, con anamnesi cardiologica personale e familiare negativa. Rilievo di allergie e psoriasi.

Esame anato-patologico macroscopico

Cuore con dilatazione biventricolare.
 Peso: 580 gr
 DL: 10.5 cm; DT: 13 cm

Sezioni trasversali lungo l'asse corto:

- estese aree biancastre di aspetto fibroso che interessano l'intero setto, la parete inferiore del Vsn e, in sede basale, la parete anteriore;
- miocardio del Vdx con aree biancastre nelle pareti anteriore e laterale con coinvolgimento del miocardio trabecolare.



Fig.15: Sarcoidosi cardiaca. Aspetto macroscopico e principali caratteristiche

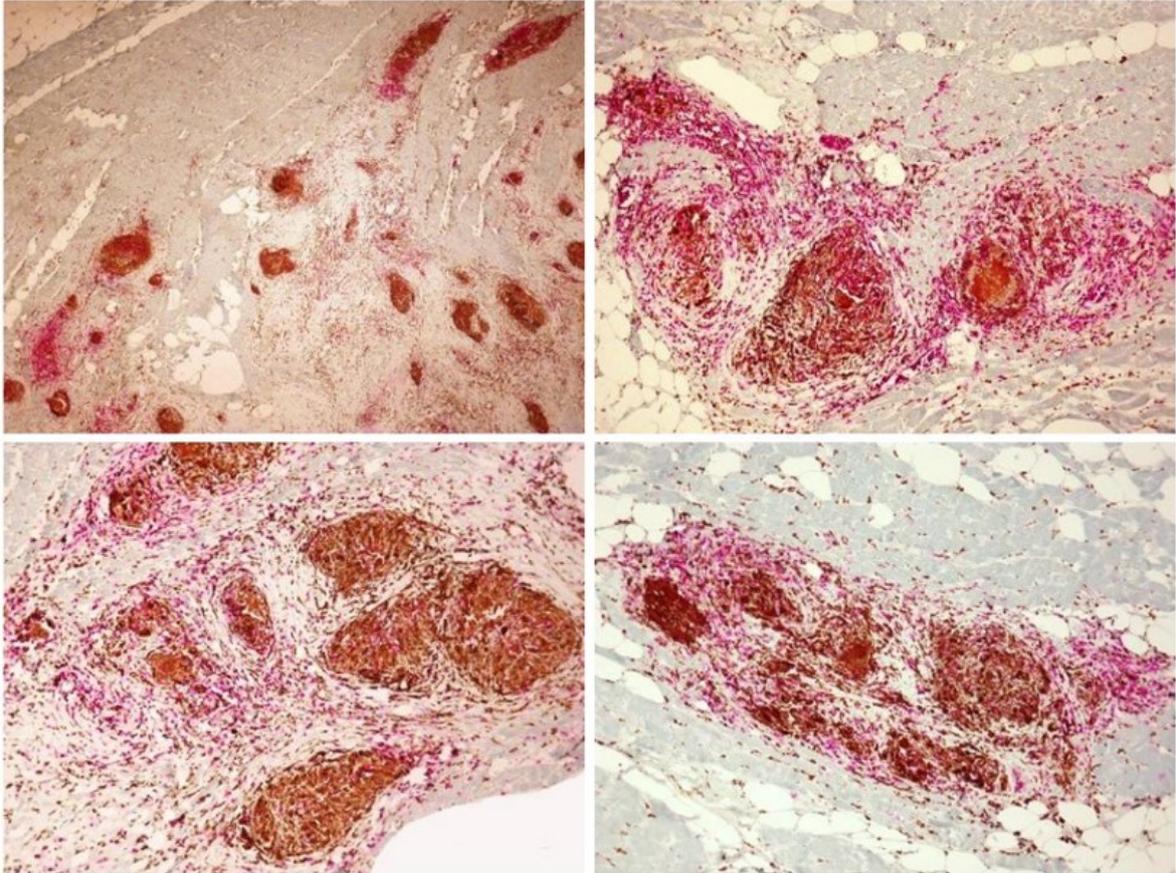


Fig.16: Sarcoidosi cardiaca: un esteso processo infiammatorio granulomatoso-gigantocellulare e linfocitario-macrofagico a carattere sostitutivo.

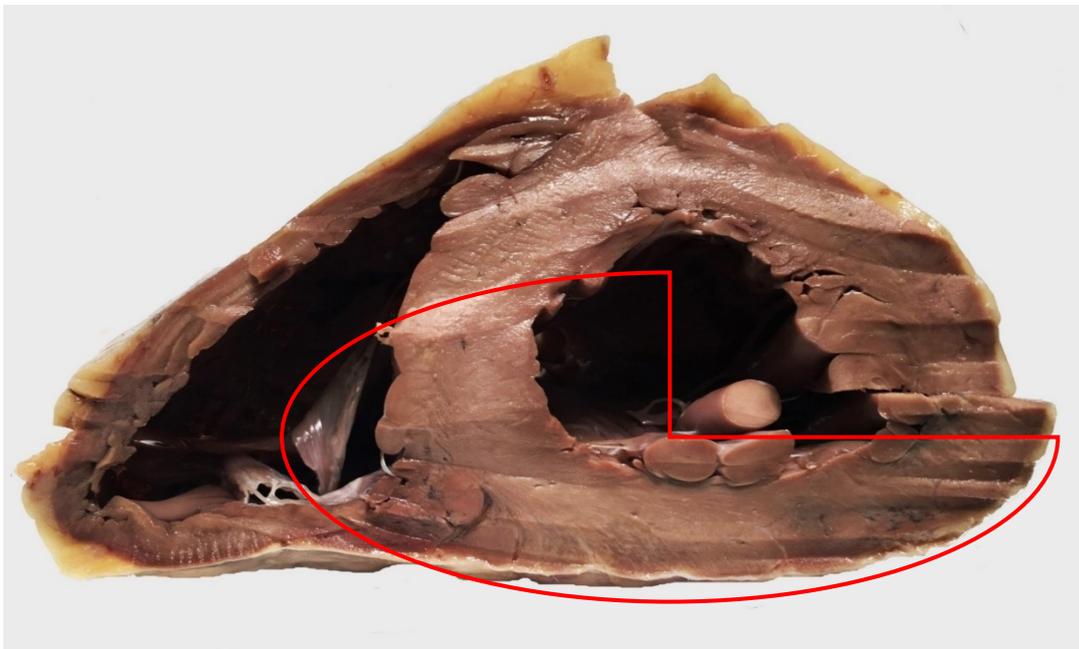


Fig.17: Sezione di miocardio della parete inferiore del ventricolo sinistro con aspetto marezzato (aree grigiastre alternate ad aree rossastre) in sede subepicardica-mediomurale coinvolgente anche il setto posteriore

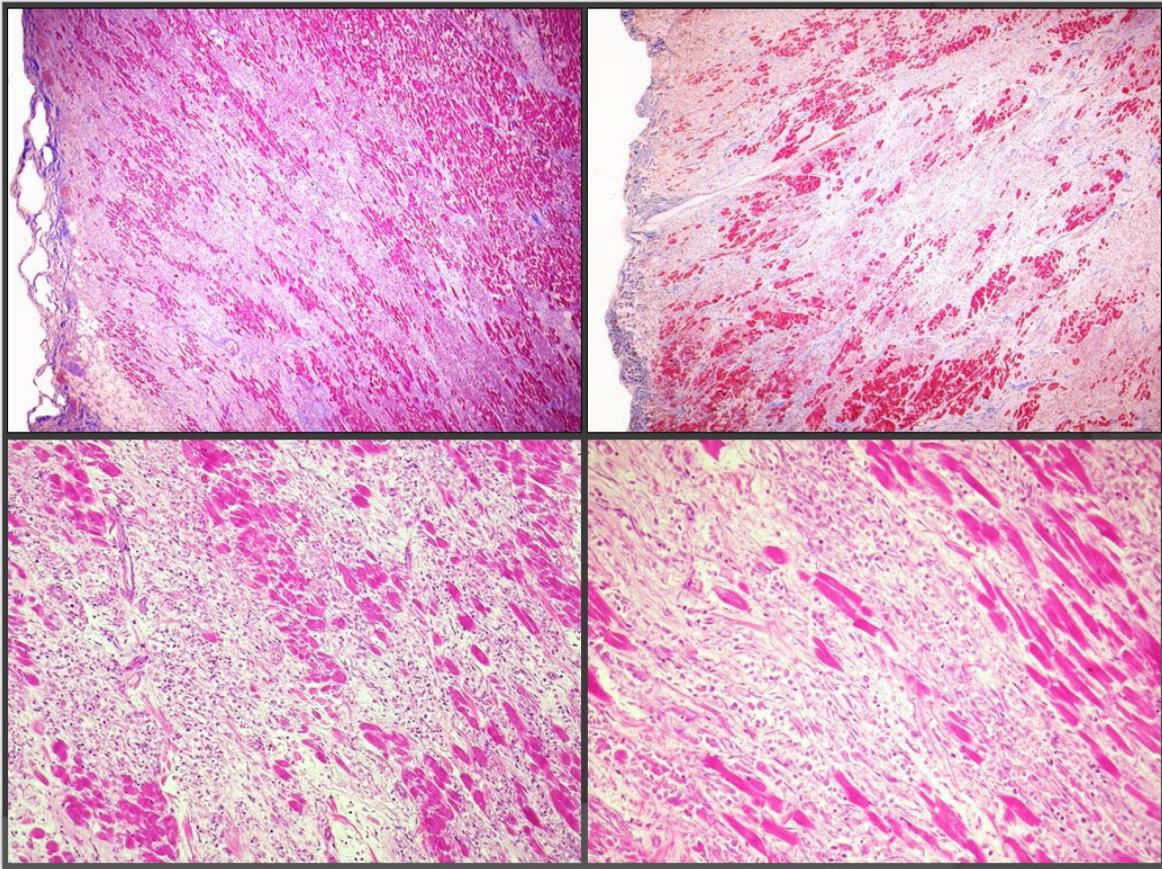


Fig.18: Miocardite eosinofila necrotizzante: massiva necrosi miocardica associata ad un infiltrato infiammatorio parzialmente necrotico

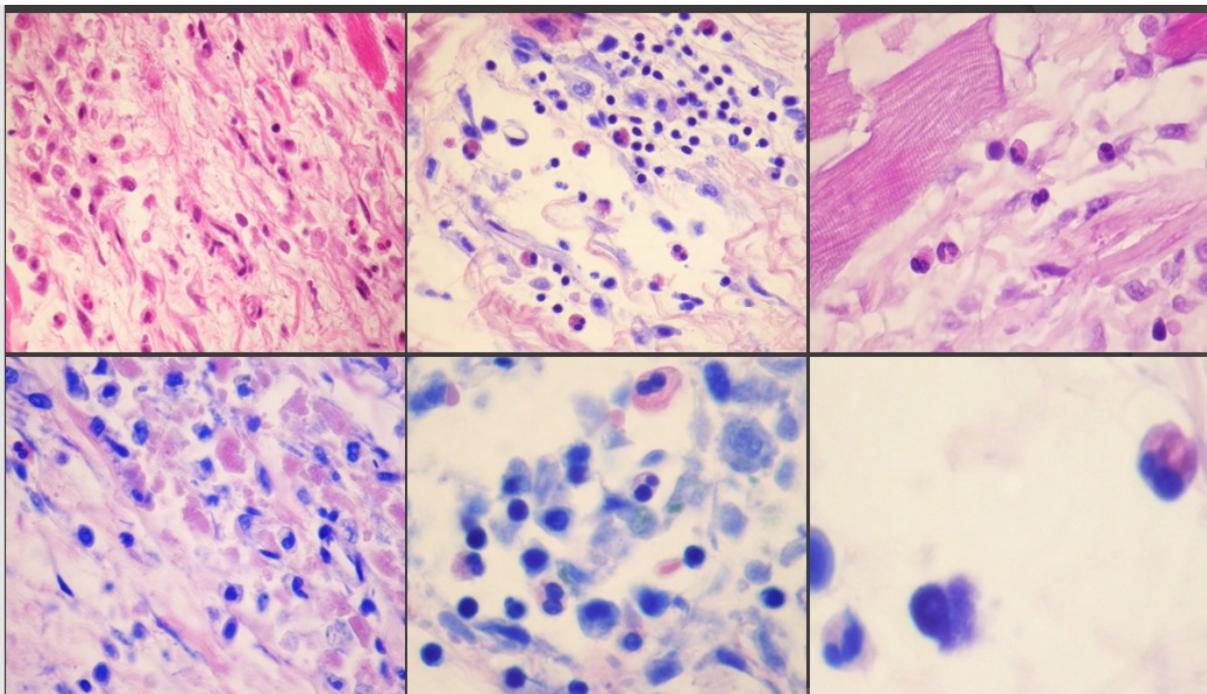


Fig.19: Miocardite eosinofila necrotizzante: macrofagi con significativa componente di granulociti eosinofili in parte degranulati

Accertamenti tossicologici

Gli esami tossicologici sono stati condotti in 11 casi (58%); di questi, 5 sono risultati positivi- (Fig. 11-12).

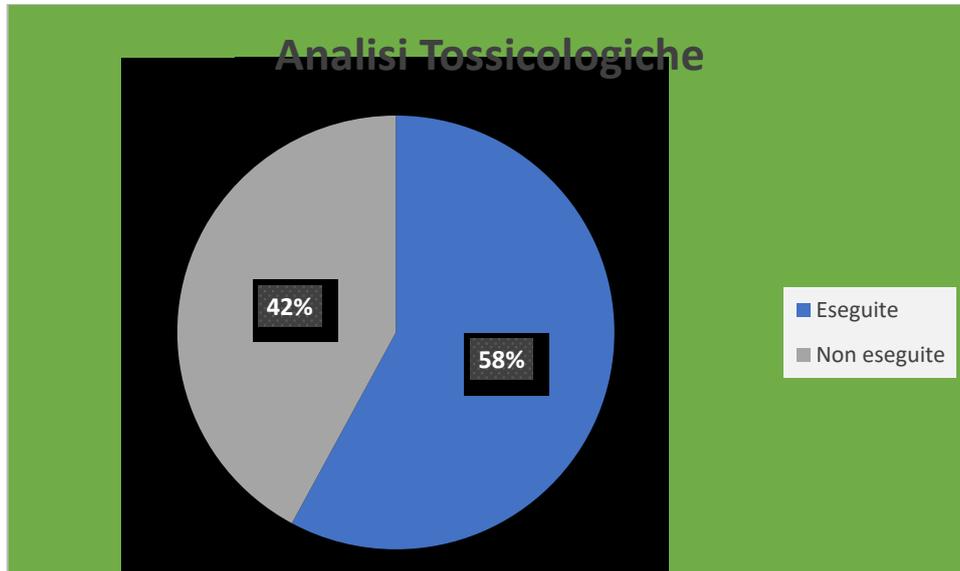


Fig.20 Analisi tossicologiche

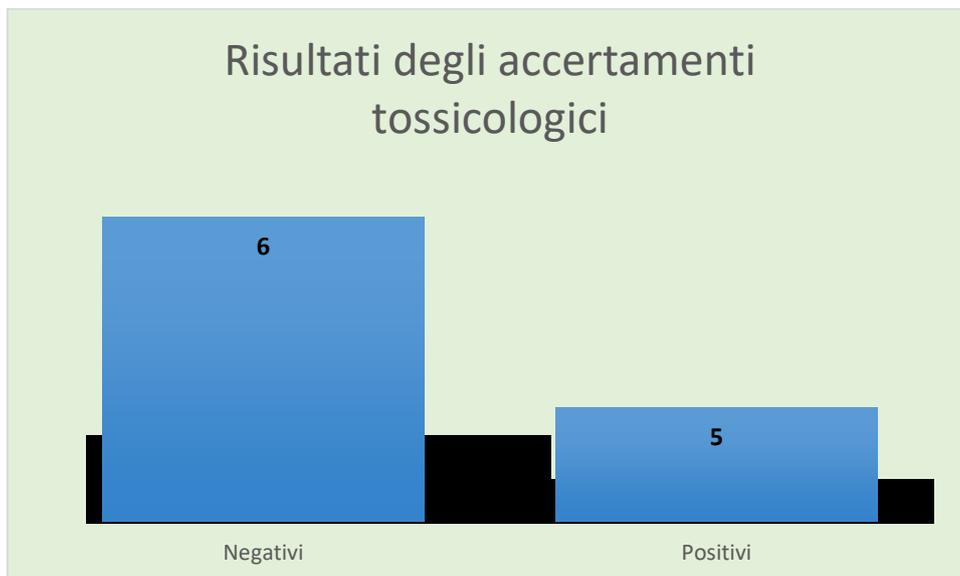


Fig.21: Risultati analisi tossicologiche

Dei 5 positivi:

- In 1 caso era presente una lieve positività a THC, ininfluyente ai fini del decesso
- In 1 caso era presente debole positività alla Cocaina con Benzoilecgonina, alcol etilico e THC nel sangue e urina
- In 1 caso era presente morfina nel range di letalità nel sangue e urina
- In 1 caso era presente una positività alcool etilico nel sangue, urine e contenuto gastrico

- In 1 caso era presente Cocaina a dosi tossiche potenzialmente letali nel sangue

In un caso l'assunzione di sostanze xenobiotiche psicoattive (eroina) ha costituito la causa unica del decesso, in un caso ha indotto la rottura di una placca aterosclerotica e la conseguente trombosi coronarica in un soggetto con severa coronaropatia ischemica cronica, giocando un ruolo concausale nel decesso per il noto effetto cardiotossico della cocaina; è stata inoltre riscontrata debole positività in un soggetto con nota Sindrome di Brugada che potrebbe aver slatentizzato un episodio aritmico in un paziente.



Fig.22: Danno Miocardico Tossico + Intossicazione da Oppiacei

Accertamenti genetici

Le indagini genetiche sono state svolte in 11 casi. (Fig. 13):

- In un caso cuore strutturalmente normale sia macroscopicamente e privo di rilievi all'istologia è stata identificata una VUS in eterozigosi nell'esone 1 del gene KCNQ1: c.136G>A deponente per LQTD
- In un caso di cardiomiopatia dilatativa idiopatica riscontrata sia macroscopicamente che confermata all'esame istopatologico si è eseguito il "Pannello NGS CMP (23 geni) e il Pannello NSG Aritmie v.2.0 (38 geni)" che hanno identificato una variante c.1936A>G nel gene AKAP10 in eterozigosi e una variante (VUS) c.181A>G, p.Ile61Val nel gene KCNE1 che ha confermato l'origine genetica della Cardiomiopatia dilatativa ed è stato impostato un percorso di screening con i familiari.
- In un caso di tamponamento cardiaco da dissezione aortica, nonostante il quadro macroscopico indicasse per una chiara causa di morte naturale si è proceduto con accertamenti istopatologici e genetici stante la possibile origine genetica di questa patologia. È stato eseguito quindi il Pannello NGS Aorta v 3 2018 (23 geni) che ha identificato Tre varianti VUS in eterozigosi: 1. gene TGFB2 missense c.703G>C p.Val235Leu (Loeys-Dietz syndrome) 2. Gene MYLK c.1486C>G p. Leu496Val

(Aortic aneurysm, familial thoracic) 3. Gene COL5A1 (Ehlers-Danlos syndrome) intronica c.1828-3C>G

- In un cuore morfologicamente normale e negativo all'Istopatologia sono stati eseguiti test genetici consistenti nel Pannello NGS CMP (23 geni) che hanno identificato variante c.1936A>G nel gene AKAP10.
- In un caso di un cuore strutturalmente normale con infiltrazione adiposa aspecifica del ventricolo destro è stato eseguito il Pannello NGS CMP (23 geni) che ha identificato una variante c.1936A>G nel gene AKAP10
- In un caso di sospetta cardiomiopatia ipertrofica è stato eseguito il Pannello CMP in corso pannello aritmie che ha identificato una variante 31: c.4525G>T (p.Glu1509Ter nel gene MYH6
- In 5 casi sono gli approfondimenti genetici sono tutt'ora in corso e su questi è stato eseguito il panel aritmie v.2.0 (38 geni).

Sono state svolte le indagini farmaco genetiche su tutti i 12 casi provenienti dal settore Bolognese, ma gli esami sono ancora in corso.

Nella totalità dei casi in cui è stata svolta l'autopsia molecolare e questa ha evidenziato la presenza di mutazioni trasmissibili geneticamente, si è deciso di estendere lo screening genetico e/o clinico anche ai familiari di primo grado. Nei casi di autopsie giudiziarie, previa autorizzazione da parte del Pubblico Ministero si è preso contatto con le famiglie per comunicare i risultati dei test genetici e contestualmente chiedere il consenso di sottoporsi ai test genetici. In un caso la madre non ha prestato il consenso per sottoporsi agli esami genetici.

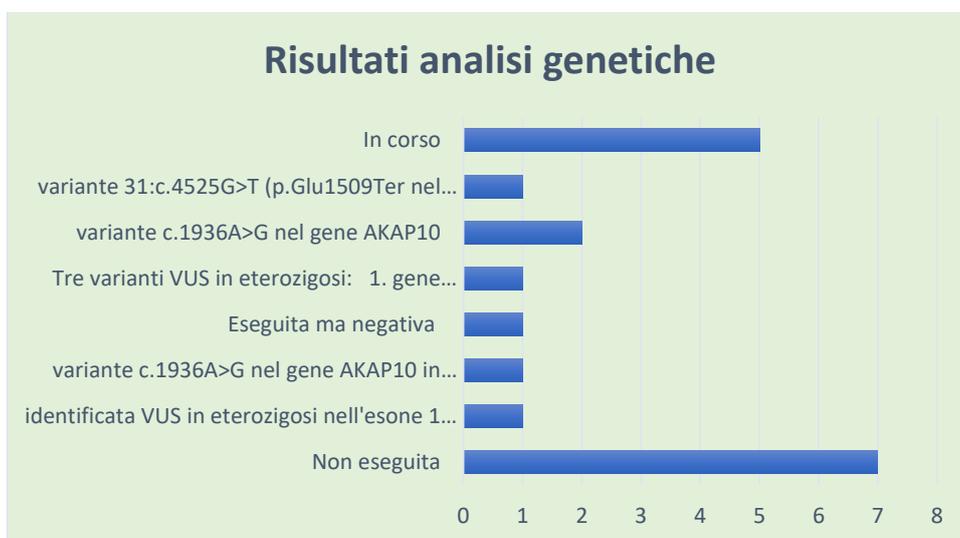


Fig.23: Risultati analisi genetiche

Analisi genetica e screening familiare

ANALISI GENETICA	
	Varianti (VUS)
Sindrome del QT lungo	KCNQ1
Cardiomiopatia dilatativa	AKAP10 + KCNE1
Cuore Normale (2 casi)	AKAP10
Dissezione Aortica	GGFB2 + MYLK + COL5A1

Patologie da indagare: sindrome di Brugada: 2; cardiomiopatia aritmogena: 1; cardiomiopatia ipertrofica: 1; cardiomiopatia dilatativa: 2; cardiopatie con fenotipo misto: 1; altre aritmie primarie: 2

Fig.24: Analisi Genetica

SCREENING FAMILIARE	
Numero famiglie studiate	4
Numero parenti studiati	12
Famiglie da studiare	12

Fig.25: Screening familiare

Accertamenti microbiologici

In 1 caso su di 19 sono stati eseguiti approfondimenti microbiologici eseguiti su sangue e cuore (Parvovirus B19, CMV, adenovirus, EBV, HHV6 risultati negativi), la causa di morte è risultata essere una miocardite linfocitaria plurifocale.

L'autopsia più successivi accertamenti istopatologici ha permesso di identificare la causa certa del decesso nel 32% dei casi;

Nel 58% dei casi, oltre all'analisi istopatologica è stato necessario eseguire anche accertamenti genetici che hanno permesso di rilevare nella totalità dei casi una causa di morte.

In 2 casi (10%) gli accertamenti tossicologici hanno indirizzato verso un tipo di decesso correlato all'intossicazione acuta da sostanza. (1 caso intossicazione da eroina, 1 caso la cocaina ha avuto un effetto cardiotossico su miocardio). (Fig. 15-15).

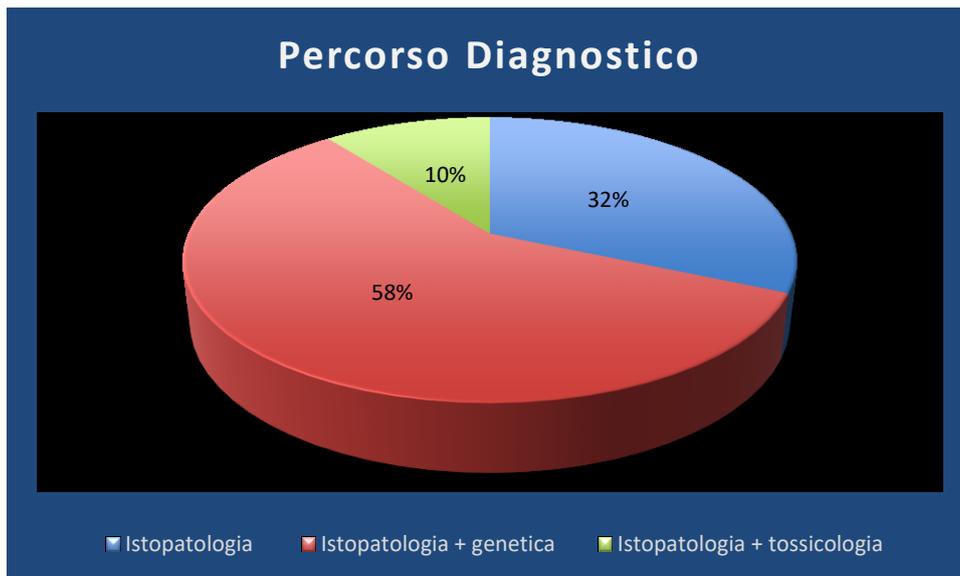


Fig.26: Percorso diagnostico per definire la causa di morte. I: istologia; T: tossicologia; G: genetica; M: microbiologia.

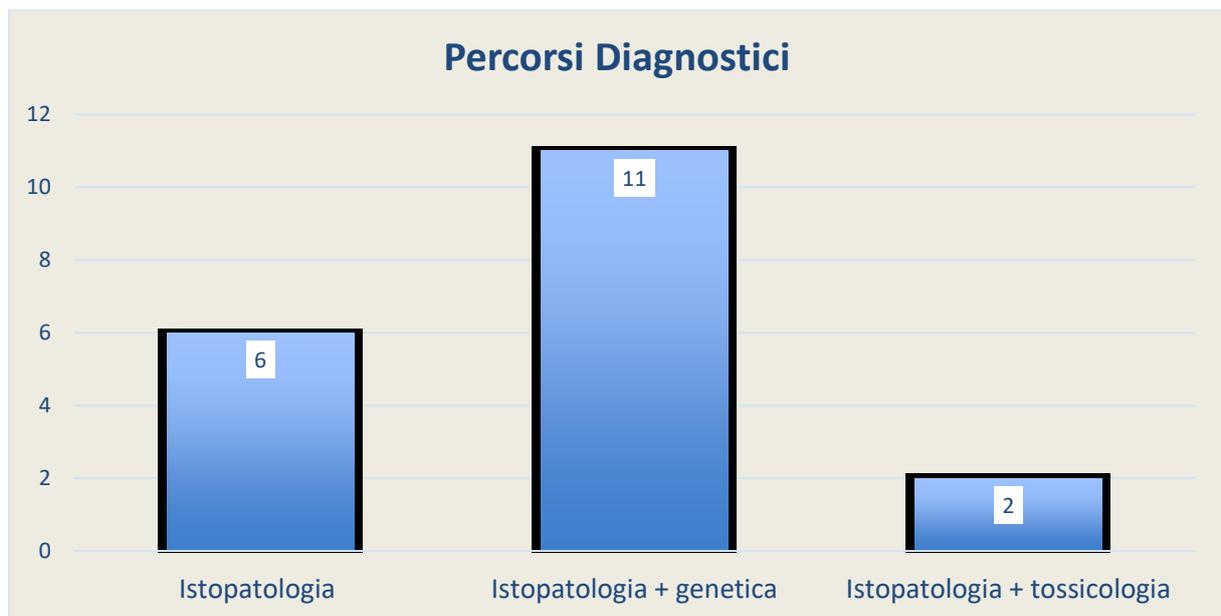


Fig.27: Indagini svolte per definire la causa di morte. I: istologia; T: tossicologia; G: genetica; M: microbiologia.

3.4 Discussione

In accordo con la letteratura di riferimento si è evidenziato che, nei casi di Morte Cardiaca Improvvisa giovanile, le canalopatie e le malattie infiammatorie del miocardio sono le cause più frequenti. Al contrario, la cardiopatia ischemica, in particolare la forma aterosclerotica (CAD), che è la causa di morte cardiaca improvvisa più frequente nei soggetti adulti¹³⁴ (> 50 anni) nella nostra casistica rappresentano solo l'11%.

Il campione studiato è costituito nell'85% da soggetti di genere maschile. Tale dato è in accordo con la letteratura di riferimento anche se sovrastima l'incidenza che l'MCI riveste nei due sessi estremizzando i dati presenti in letteratura¹³⁵, in cui l'incidenza nel genere maschile è tre volte superiore a quella femminile in età fertile. La spiegazione di ciò risiede nell'effetto protettivo che gli ormoni femminili hanno sul sistema cardiovascolare, impedendo lo sviluppo di aterosclerosi coronarica.

Nella nostra casistica la maggior parte dei casi di MCI (47%) si sono verificati durante il sonno, il 29% mentre il soggetto era a riposo. Questo dato trova conferma anche in altri studi^{136, 137}, la morte durante il sonno può essere causata da scariche di attività vagale e simpatica durante la fase REM del sonno, che portano ad aritmie scatenate da trigger adrenergici, ma possono essere coinvolti anche meccanismi non adrenergici. Purtroppo, però si dispone di poche conoscenze in merito alla correlazione tra MCI e sonno/riposo; sarebbe quindi utile aumentare le conoscenze dei meccanismi associati, in modo da aumentare le strategie preventive per la MCI giovanile.

Quello che emerge chiaramente è che l'indagine istologica deve sempre essere eseguita in tutte le autopsie giudiziarie, come peraltro è avvenuto nel nostro campione. La sola istologia, associata all'osservazione macroscopica del cuore, è stata da sola sufficiente per definire la causa del decesso nelle forme ischemiche, nella cardiomiopatia dilatativa e nelle patologie del miocardio rappresentanti complessivamente il 32% dei casi analizzati. In quest'ultimo gruppo sono state individuate due cause estremamente rare di MCI, sarcoidosi cardiaca e miocardite

¹³⁴ Zachariasardóttir, S. *et al.* Sudden cardiac death and coronary disease in the young: A nationwide cohort study in Denmark. *International Journal of Cardiology* **236**, 16–22 (2017).

¹³⁵ Rizzo, S., Corrado, D., Thiene, G. & Basso, C. La morte cardiaca improvvisa nella donna. *G ITAL CARDIOL* **13**, 8 (2012).

¹³⁶ Bagnall, R. D. *et al.* A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults. *New England Journal of Medicine* **374**, 2441–2452 (2016).

¹³⁷ Wisten, A., Krantz, P. & Stattin, E.-L. Sudden cardiac death among the young in Sweden from 2000 to 2010: an autopsy-based study. *Europace* (2016).

eosinofila necrotizzante, che presentano un'incidenza bassissima nella popolazione generale e ancora più bassa di morte improvvisa^{138, 139}

Le indagini tossicologiche hanno sempre ricoperto un ruolo fondamentale all'interno del percorso d'indagine autoptico nei casi di autopsie giudiziarie. Dall'analisi della nostra casistica si evince in due occasioni hanno consentito di definire in maniera precisa il meccanismo fisiopatologico che ha portato al decesso, tuttavia, un solo caso l'assunzione di sostanze è stata da sola idonea a provocare il decesso (morfina). La scarsa presenza di decessi correlate ad assunzione di sostanze xenobiotiche deriva dal fatto che per il Progetto Morte Improvvisa giovanile si era scelto di escludere casi in cui fosse estremamente probabile l'assunzione di sostanze, ad esempio per il dato circostanziale di rinvenimento di sostanze accanto al corpo o per il dato anamnestico di tossicodipendenza cronica o di recente assunzione prima del decesso di sostanze riferita da terzi.

La sostanza stupefacente maggiormente rilevata nei casi esaminati è stata la cocaina, stimolante che anche in letteratura viene indicato come droga maggiormente coinvolta nelle MCI a causa del suo noto effetto sul miocardio. È noto che in più del 9% dei giovani colpiti da MCI vi è stata un'assunzione recente di cocaina¹⁴⁰, e questo dato è in parte confermato anche dalla nostra casistica in cui è stata individuata nel 11% dei casi. L'assunzione di cocaina ha azione simpaticomimetica con aumento della contrattilità miocardica, della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa inducendo uno squilibrio tra fabbisogno e apporto di ossigeno al miocardio. Inoltre essa può indurre vasocostrizione e trombosi attraverso complessi meccanismi che comprendono l'inibizione della sintesi dell'ossido nitrico, l'aumentato rilascio di endotelina-1, fibrinogeno e fattore Von Willebrand, che favoriscono l'evento ischemico.¹²⁶ La cocaina ha slatentizzato una Sindrome di Brugada che ha condotto ad un evento aritmico fatale; ciò è stato possibile grazie alla potente azione di bloccante del canale del Na⁺ che la cocaina presenta, e al suo notevole effetto simpaticomimetico.¹²⁷

Gli esiti dei successivi accertamenti genetici hanno individuato mutazioni a carico di AKAP10 in due casi e KCNQ1 in un caso. La prima è una VUS (Variant of Unknown Significant) descritta in letteratura come fattore di rischio per difetti di conducibilità cardiaca ma con un'alta frequenza nella popolazione (EMAF=0,3835) e per questo non considerata

¹³⁸ Habersberger, J., Manins, V. & Taylor, A. J. Cardiac sarcoidosis. *Internal Medicine Journal* **38**, 270–277 (2008).

¹³⁹ Brambatti, M. *et al.* Eosinophilic Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* **70**, 2363–2375 (2017).

¹⁴⁰ Morentin, B., Ballesteros, J., Callado, L. F. & Meana, J. J. Recent cocaine use is a significant risk factor for sudden cardiovascular death in 15–49-year-old subjects: a forensic case–control study. *Addiction* **109**, 2071–2078 (2014).

patogenetica; la seconda invece rappresenta una variante di significato incerto nel gene che codifica per un canale del potassio. Mutazioni in questo gene sono ritenute responsabili di patologie cardiache tra cui Fibrillazione Atriale familiare e sindromi del QT lungo e QT corto. Tale mutazione ha una frequenza allelica inferiore rispetto alla precedente nella popolazione europea (1 su 6000) ma presenta comunque una classificazione ambigua in ClinVar, motivo per cui non può essere definita con certezza patogenetica.

L'interpretazione di queste varianti genetiche è sempre un problema complesso. Alla luce degli esiti ambigui dei test genetici post-mortem, è stata necessaria una valutazione specifica per ciascun caso, per decidere quali test eseguire nello screening sui familiari di primo grado delle vittime.

Per la mutazione su AKAP10, in un caso verrà eseguito lo screening clinico (ECG a riposo e sotto sforzo) nei fratelli della vittima e il test genetico in entrambi i genitori; nell'altro caso invece si eseguirà esclusivamente lo screening clinico sui figli, dato che la madre della vittima non ha dato il consenso per lo screening genetico. Alla luce di questi risultati sarà possibile definire non solo il rischio di aritmie fatali dei familiari delle vittime, ma probabilmente anche il ruolo che la mutazione ha avuto nel decesso. L'analisi di quest'ultimo caso ha permesso, inoltre, di sottolineare come la tematica del consenso informato abbia ripercussione di rilievo nella pratica clinica. Infatti, scegliere di sottoporsi a test predittivi, deve essere attentamente considerato da persona a persona in base all'età, al carattere e al progetto o aspettative di vita attraverso un colloquio informato la consulenza effettuata dal genetista.

Infatti, sebbene i test genetici possano apportare benefici grazie ad una diagnosi certa e ad una migliore conoscenza dei trattamenti preventivi e della stratificazione del rischio, essi possono anche contribuire a depressione, ansia, colpevolezza, discriminazione, conflitti familiari e uso inappropriato o non necessario di strategie per la riduzione del rischio.

Il caso della sindrome di Brugada deve essere ancora sottoposto ai test genetici post-mortem, e in seguito, in base al risultato, si deciderà se sottoporre anche i correlati a screening. Il dato anamnestico di sindrome di Brugada era già noto e anche l'esame istopatologico del cuore ha mostrato un'infiltrazione adiposa miocardica che può associarsi a tale quadro patologico. Per questi motivi, il test genetico non è stato tanto fondamentale per la diagnosi clinica, quanto per poter valutare successivamente il rischio aritmico dei familiari di primo grado.

Nei casi in cui è stata individuata una malattia sporadica alla base dell'MCI (sarcoidosi cardiaca, miocardite eosinofila, cardiopatia ischemica), si è esclusa la necessità di una valutazione della famiglia.

Nel caso del decesso riconducibile a tamponamento cardiaco pur essendo stata identificata la causa della morte sono stati eseguiti indagini genetiche alla luce del substrato genetico che di frequente accompagna queste patologie. In questo caso il Progetto Morte Improvvisa giovanile ha permesso, di eseguire accertamenti per una finalità che non è più l'identificazione della causa di morte (essendo già identificata all'autopsia) e nemmeno per escludere ipotesi di reato, definita la "naturalità" della dissecazione aortica. Tuttavia, in casi come questo, l'approfondimento genetico e la scoperta di una variante genetica associata ha permesso di intraprendere un percorso di screening per le famiglie in senso preventivo.

Da questo studio emerge come la casistica maggiore (65%) provenga da autopsie giudiziarie in accordo con quanto detto in precedenza che, a causa della modalità del decesso, extra ospedaliera, le autopsie sono quasi invariabilmente eseguite da patologi forensi su indicazione dell'autorità giudiziaria, anche per escludere ipotesi di reato o coinvolgimenti di terzi. La relativa bassa casistica è coerente con il dato internazionale della progressiva riduzione del numero di riscontri autoptici eseguiti presso i policlinici universitari e presso le strutture ospedaliere per motivazioni legate anche a ragioni economiche.

Nella realtà italiana, il medico legale lavora in gran parte in risposta alle richieste dei magistrati o di altre autorità giudiziarie. In accordo con letteratura in materia, anche di ambito internazionale, tra le motivazioni che impediscono di eseguire indagini molecolari nell'ambito di autopsie giudiziarie vi sono quelle di origine economica in considerazione del fatto che le attività Medico Legali sono pagate dalla Pubblica Amministrazione su autorizzazione dell'Autorità Giudiziaria.

Il dato che è emerso dall'analisi della nostra casistica medico legale di morte improvvisa giovanile è che l'apporto integrato della autopsia completa, con successivi accertamenti eseguiti o sequenzialmente o in modo alternativo tra loro hanno permesso di identificare nella totalità dei casi una chiara causa di morte, permettendo inoltre, nei casi in cui la genetica aveva giocato un ruolo causale nel decesso di intervenire mediante screening sui familiari attuando strategie preventive in grado di prevenire ulteriori decessi per MCI.

In accordo con la letteratura esaminata la casistica riportata nel nostro studio ha confermato i dati presenti in letteratura in merito alle cause di MCI in soggetti giovani suggerendo un substrato aritmico come causa di MCI che è stato approfondito mediante l'esecuzione di test genetici post-mortem che negli ultimi anni ha ottenuto grandi progressi nel campo della genetica, specialmente grazie all'introduzione della tecnica NGS (Next Generation Sequencing).

In questi casi, e in quelli in cui vi era un forte sospetto di patologia ereditaria, è stata messa in atto un'importante misura preventiva, ovvero una rete di consulenza clinica e genetica per i familiari di primo grado delle vittime. Grazie ad uno screening genetico, è stato possibile confermare o escludere, nei correlati del deceduto, la presenza delle stesse mutazioni della vittima; inoltre, grazie ad uno screening clinico è stato possibile individuare soggetti pre-sintomatici a rischio di eventi fatali e definire meglio il significato clinico delle varianti riscontrate. Le varianti di origine sconosciuta (VUS) possono creare ansia e incertezza e va contemplata la possibilità di avere risultati “incidental” su questioni cliniche che non si stavano cercando¹⁴¹. È inoltre possibile ipotizzare il riscontro di risultati accidentali aumenterà quasi certamente nel tempo man mano che verranno identificate più associazioni di malattie genetiche. Sorgeranno domande su quali risultanze accidentali il laboratorio dovrebbe riferire al medico che ha ordinato gli esami, come i clinici dovrebbero gestire queste informazioni e, in particolare, quali dovrebbero essere utilizzate e quali risultanze divulgare al paziente.

Uno spunto di riflessione dovrebbe nascere dal dato evidente che negli ultimi anni si è assistito una progressiva riduzione del numero di riscontri autoptici - spesso dettato da motivi economici - eseguiti presso i policlinici universitari e presso le strutture ospedaliere e dalla ripercussione che questo potrebbe avere in termini di prevenzione della MCI giovanile. Nei casi di Morte Cardiaca Improvvisa spesso, il decesso costituisce la prima manifestazione clinica della malattia e pertanto l'autopsia gioca un ruolo centrale nel percorso diagnostico e nella definizione eziologica delle cause di morte. Infatti, l'identificazione di una patologia cardiaca ereditaria, possibile mediante autopsia completa rappresenta la premessa per poter pianificare una consulenza cardiologica e genetica multidisciplinare per i parenti prossimi delle vittime di MCI.

¹⁴¹ Clayton EW, Haga S, Kuszler P, Bane E, Shutske K, Burke W. Managing incidental genomic findings: legal obligations of clinicians. *Genet Med.* 2013 Aug;15(8):624-9. doi: 10.1038/gim.2013.7. Epub 2013 Feb 28. PubMed PMID: 23448723; PubMed Central PMCID: PMC3805501.

Conclusioni

L'analisi della casistica forense ha confermato come l'approccio integrato e multidisciplinare tra l'autopsia successivi accertamenti laboratoristici sia, ad oggi, imprescindibile e svolga un ruolo centrale nel percorso diagnostico e nella definizione eziologica delle cause di Morte Cardiaca Improvvisa in quanto, spesso, il decesso costituisce la prima manifestazione clinica della malattia.

Sulla base dei reperti riscontrati all'autopsia è possibile selezionare i casi da sottoporre a ulteriori indagini, fra cui quelle genetiche nelle malattie cardiache ereditarie che sono stati fondamentali per avviare, in casi specifici, con sospetto di patologie ereditarie, consulenza e screening genetici e/o clinici sui correlati delle vittime.

I progressi nel campo della biologia molecolare e della genetica umana hanno identificato l'origine genetica di molte malattie cardiache responsabili di morte cardiaca improvvisa giovanile e poiché molte di queste malattie sono ereditarie, stabilire una diagnosi post mortem di una vittima di MCI è di assoluto rilievo per i familiari del deceduto in quanto la MCI può essere prevenuta se viene avviato il trattamento appropriato nei soggetti portatori di queste mutazioni.

Pertanto, la creazione di questa rete multidisciplinare in stretta correlazione con l'Autorità Giudiziaria, che per le modalità improvvise e inattese del decesso è coinvolta nella maggior parte dei casi di MCI, ha permesso di migliorare la capacità diagnostica nei casi di Morte Cardiaca Improvvisa e quindi ridurre quella percentuale di SUD svolgendo accertamenti di natura genetica che, prima dell'attivazione del Progetto Morte Improvvisa giovanile, non sempre era possibile eseguire anche alla luce dei costi elevati di accertamenti laboratoristici, che non potevano gravare sull'Autorità Giudiziaria.

Nei casi di MCI, i test genetici post-mortem acquisiti da campioni prelevati in corso di autopsia e svolti mediante i finanziamenti della Fondazione Fanti Melloni, hanno potuto e potranno consentire quindi all'autopsia di svolgere anche un ruolo di medicina preventiva, come ricordato dalla frase che capeggia nella maggior parte delle sale autoptiche "hic mors gaudet succurere vitae".

Infatti, nel rendersi conto che non è possibile una strategia di prevenzione applicabile alla popolazione generale, è ragionevole ritenere che uno *screening mirato* ai sottogruppi a maggior rischio come gli atleti, i giovani con sintomi cardiaci e le famiglie con storia di morte improvvisa possa essere applicato.¹¹⁴

I familiari delle vittime di morte cardiaca improvvisa rappresentano, nell'ambito della popolazione generale, un sottogruppo ad alto rischio su cui concentrare le strategie di prevenzione della morte improvvisa, attraverso un'accurata valutazione clinico-strumentale ed eventualmente genetica, che permetta la diagnosi tempestiva di cardiopatie subcliniche e quindi l'applicazione di algoritmi di stratificazione del rischio e di possibili terapie.

Anche la casistica evidenzia come una percentuale non trascurabile delle autopsie esaminate è stata riscontrato un substrato patologico geneticamente determinato e pertanto conferma come i casi di morti cardiache improvvise vadano inserite in progetti di strategie preventive nell'ambito di salute pubblica.

In accordo con la letteratura esaminata la casistica riportata nel nostro studio ha confermato che mediante un approccio autoptico completo e sequenziale, è stato possibile diagnosticare un maggior numero di patologie cardiache ereditarie ed inoltre questi dati sono stati utilizzati per eseguire un adeguato screening genetico e/o clinico sui correlati delle vittime.

I casi analizzati, insieme ad altri provenienti da altre città dell'Emilia-Romagna, andranno tutti a costituire un "Registro Regionale delle Morti Improvvise giovanili", in modo da avere una visione più ampia e precisa del fenomeno.

Anche grazie al Progetto Morte Improvvisa potranno accrescere le conoscenze possedute sulla MCI con l'obiettivo di ridurre l'incidenza di questo tragico evento grazie a strategie preventive come ICD e controlli cardiologici in soggetti a rischio, andando selettivamente a concentrarci su popolazione a rischio, quali correlati di deceduti, individuati mediante l'autopsia. L'esame autoptico sistematico del cuore comprensivo di indagini molecolari è la base per intraprendere percorsi di screening cardiologico familiare, secondo precisi algoritmi diagnostici, al fine di prevenire, nei parenti vivi, eventi fatali correlati a cardiomiopatie o ad aritmie su base genetica.

Dovrebbe quindi far riflettere sulle ripercussioni che il progressivo decremento del numero di autopsie potrebbe avere in termini di prevenzione della MCI giovanile in quanto l'identificazione di una patologia cardiaca ereditaria, possibile mediante autopsia completa rappresenta la premessa per poter pianificare screening cardiologico per i parenti prossimi delle vittime di MCI.

Bibliografia

1. Ackerman, M. J. 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). *EP Europace* 13, 1077–1109 (2011).
2. Ackerman, M., Atkins, D. L. & Triedman, J. K. Sudden Cardiac Death in the Young. *Circulation* (2016).
3. Albert, C. M. Triggering of Sudden Death from Cardiac Causes by Vigorous Exertion. *The New England Journal of Medicine* 7 (2000).
4. Argelia, M.-D. et al. Recommendations for genetic testing and counselling after sudden cardiac death: practical aspects for Swiss practice. *Swiss Medical Weekly* (2018)
5. Arnestad M., Crotti L., Rognum T.O., Insolia R., Pedrazzini M., Ferrandi C., et al., Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome, *Circulation* 115 (2007) 361–367.
6. Ashwell, M. & Gibson, S. Waist-to-height ratio as an indicator of ‘early health risk’: simpler and more predictive than using a ‘matrix’ based on BMI and waist circumference. *BMJ Open* 6, e010159 (2016).
7. Atteya, G. & Lampert, R. Sudden Cardiac Death in Genetic Cardiomyopathies. *Cardiac Electrophysiology Clinics* 9, 581–603 (2017).
8. Autore C., Pagannone E., et Al., Screening cardiologico delle famiglie con storia di morte improvvisa giovanile: quali patologie ricercare e con quali strumenti *G Ital Cardiol* Vol 11 Luglio-Agosto 2010
9. Autore, C. et al. Screening cardiologico delle famiglie con storia di morte improvvisa giovanile: quali patologie ricercare e con quali strumenti. 11, 9 (2010).
10. Bagnall R.D., Weintraub R. G., Ingle J. et al. A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults, June 23, 2016 *N Engl J Med* 2016; 374:2441-2452 DOI: 10.1056/NEJMoa1510687
11. Bagnall, R. D. et al. A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults. *New England Journal of Medicine* 374, 2441–2452 (2016).

12. Basso C, Aguilera B, Banner J, Cohle C, d'Amati G, Henriques de Gouveia R, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch.* 2017; 471:691–705.
13. Basso C, Calabrese F, Corrado D, Thiene G. Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovasc Res* 2001; 50: 290-300.
14. Basso, B. C. et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv* 452, 11–18 (2008).
15. Basso, C. et al. Hypertrophic cardiomyopathy and sudden death in the young: pathologic evidence of myocardial ischemia. *Hum. Pathol.* 31, 988–998 (2000).
16. Basso, C. et al. Sudden cardiac death with normal heart: molecular autopsy. *Cardiovasc. Pathol.* 19, 321–325 (2010).
17. Basso, C., Calabrese, F., Angelini, A., Carturan, E. & Thiene, G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev* 18, 673–681 (2013).
18. Belsey, S. L. & Flanagan, R. J. Postmortem biochemistry: Current applications. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 41, 49–57 (2016).
19. Betensky, B. P. & Dixit, S. Sudden cardiac death in patients with nonischemic cardiomyopathy. *Indian Heart Journal* 66, S35–S45 (2014).
20. Bjune, T. et al. Post-mortem toxicology in young sudden cardiac death victims: a nationwide cohort study. *EP Europace* 20, 614–621 (2018).
21. Blokker BM, Weustink AC, Hunink MGM, Oosterhuis JW. Autopsy rates in the Netherlands: 35 years of decline. *PLoS One.* 2017 Jun 15;12(6): e0178200. doi: 10.1371/journal.pone.0178200. eCollection 2017. PubMed PMID: 28617835; PubMedCentral PMCID: PMC5472266
22. Brambatti, M. et al. Eosinophilic Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* 70, 2363–2375 (2017).
23. Branzi, A. & Picchio, F. M. Core curriculum. *Cardiologia.* (McGraw-Hill Education, 2013).
24. Brinkmann B. Harmonization of medico-legal autopsy rules. Committee of Ministers. Council of Europe. *Int J Leg Med.* 1999; 113:1–14.
25. Calcagnino, M., Crocamo, A. & Ardissino, D. La genetica per predire il rischio di morte improvvisa. (2016).

26. Camm AJ. Clinical trial design to evaluate the effects of drugs on cardiac repolarization: current state of the art. *Heart Rhythm* 2005;2: S23-S29.
27. Campuzano, O. et al. Negative autopsy and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine* 128, 599–606 (2014).
28. Candy David C A, Sudden unexplained death: evaluation of those left behind, *The Lancet* Vol 362 November 1, 2003
29. Chugh SS, Jui J, Gunson K, et al. Current burden of sudden cardiac death: multiple source surveillance versus retrospective death certificate-based review in a large U.S. community. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44:1268–75.
30. Chugh SS, Kelly KL, Titus JL. Sudden cardiac death with apparently normal heart. *Circulation* 2000; 102:649-54.
31. Clayton EW, Haga S, Kuszler P, Bane E, Shutske K, Burke W. Managing incidental genomic findings: legal obligations of clinicians. *Genet Med.* 2013 Aug;15(8):624-9. doi: 10.1038/gim.2013.7. Epub 2013 Feb 28. PubMed PMID: 23448723; PubMed Central PMCID: PMC3805501.
32. Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res* 2001; 50: 399-408
33. Council of Europe. Recommendation No. R (99) 3 of the Committee of Ministers to member States on the harmonisation of medico-legal autopsy rules⁷ (Adopted by the Committee of Ministers on 2 February 1999 at the 658th meeting of the Ministers' Deputies). *Texts of the Council of Europe on bioethical matters.* Strasbourg, 2014. p. 72–85.
34. David C A Candy, Sudden unexplained death: evaluation of those left behind *THE LANCET* Vol 362 November 1, 2003
35. De Salvia, A., De Leo, D., Carturan, E. & Basso, C. Sudden cardiac death, borderline myocarditis and molecular diagnosis: evidence or assumption? *Med Sci Law* 51 Suppl 1, S27-29 (2011).
36. Elger BS, Michaud K, Fellmann F, Mangin P. Sudden death: ethical and legal problems of post-mortem forensic genetic testing for hereditary cardiac diseases. *Clin Genet.* 2010 Mar;77(3):287-92. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01293.x. Epub 009 Oct 23. PubMed PMID: 19863545.
37. Emery, M. S. & Kovacs, R. J. Sudden Cardiac Death in Athletes. *JACC: Heart Failure* 6, 30–40 (2018).

38. Feldman, A. M. & McNamara, D. Myocarditis. *New England Journal of Medicine* 343, 1388–1398 (2000).
39. Fellmann F, van El CG, Charron P, Michaud K, Howard HC, Boers SN, Clarke AJ, Duguet AM, Forzano F, Kaufenstein S, Kayserili H, Lucassen A, Mendes Á, Patch C, Radojkovic D, Rial-Sebbag E, Sheppard MN, Tassé AM, Temel SG, Sajantila A, Basso C, Wilde AAM, Cornel MC; on behalf of European Society of Human Genetics, European Council of Legal Medicine, European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases, European Reference Network for rare, low prevalence and complex diseases of the heart (ERN GUARD-Heart), Association for European Cardiovascular Pathology. European recommendations integrating genetic testing into multidisciplinary management of sudden cardiac death. *Eur J Hum Genet.* 2019 Jun 24. doi: 10.1038/s41431-019-0445-y. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31235869.
40. Fernández-Rodríguez, A. et al. Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 570–579 (2019).
41. Garcia-Elias, A. & Benito, B. Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 692 (2018).
42. Gioia CR, Autore C, Romeo DM, et al. Sudden cardiac death in younger adults: autopsy diagnosis as a tool for preventive medicine. *Hum Pathol* 2006; 37: 794-801. L'importanza dell'indagine autoptica nello studio della morte improvvisa giovanile. L'esperienza nella Regione Lazio
43. Girolami, F. et al. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *Journal of Cardiovascular Medicine* 19, 1–11 (2018).
44. Goldstein S (1982) The necessity of a uniform definition of sudden coronary death: witnessed death within 1 hour of the onset of acute symptoms. *Am Heart J* 103:156–159
45. Guidelines on autopsy practice: Deaths in patients with epilepsy including sudden deaths July 2019 The Royal College of Pathologists
46. Guidelines on autopsy practice: Sudden death with likely cardiac pathology July 2015 The Royal College of Pathologists
47. Habersberger, J., Manins, V. & Taylor, A. J. Cardiac sarcoidosis. *Internal Medicine Journal* 38, 270–277 (2008).

48. Halliday, B. P., Cleland, J. G. F., Goldberger, J. J. & Prasad, S. K. Personalizing Risk Stratification for Sudden Death in Dilated Cardiomyopathy: The Past, Present, and Future. *Circulation* 136, 215–231 (2017).
49. Hellenthal N, Gaertner-Rommel A, Klauke B, Paluszkiewicz L, Stuhr M, Kerner T, Farr M, Püschel K, Milting H. Molecular autopsy of sudden unexplained deaths reveals genetic predispositions for cardiac diseases among young forensic cases. *Europace*. 2017 Nov 1;19(11):1881-1890. doi: 10.1093/europace/euw247. PubMed PMID: 29016939.
50. <https://www.epicentro.iss.it/itoss/pdf/5%20marzo%202015/AnatomiaPatologica.pdf>
51. Hudzik, B., Hudzik, M., Lekston, A. & Gasior, M. Sudden unexplained cardiac deaths in young adults: a call for multidisciplinary approach. *Acta Cardiologica* 73, 7–12 (2018).
52. Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001; 345: 1473-82.
53. Kaufenstein S, Kiehne N, Jenewein T, Biel S, Kopp M, König R, Erkapic D, Rothschild M, Neumann T. Genetic analysis of sudden unexplained death: a multidisciplinary approach. *Forensic Sci Int*. 2013 Jun 10;229(1-3):122-7. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.050. Epub 2013 Apr 30. PubMed PMID: 23683917.
54. Kornegoor, R., Brosens, L. A. A., Roothaan, S. M., Smits, A. J. J. & Vink, A. Digitalization of post-mortem coronary angiography. *Histopathology* 55, 760–761 (2009).
55. Kuriachan, V. P., Sumner, G. L. & Mitchell, L. B. Sudden Cardiac Death. *Current Problems in Cardiology* 40, 133–200 (2015).
56. Legge 22 dicembre 2017, n. 219, in materia di ‘Consenso informato e disposizioni anticipate di trattamento’
57. Liberthson RR, Sudden death from cardiac causes in children and young adult, *N Engl J Med*. 1996 Apr 18;334(16):1039-44
58. Wilhelma M., a Bolligerb S, Bartschb C. Sudden cardiac death in forensic medicine – Swiss recommendations for a multidisciplinary approach, *Swiss Med Wkly*. 2015;145: w14129
59. Maron, B. J. & Maron, M. S. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet* 381, 242–255 (2013).

60. McGuire, A. L. et al. The ethics of conducting molecular autopsies in cases of sudden death in the young. *Genome Res.* 26, 1165–1169 (2016).
61. Michaud K, Mangin P, Elger BS. Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices. *Int J Legal Med.* 2011 May;125(3):359-66. doi: 10.1007/s00414-010-0474-0. Epub 2010 Jun 11. PubMed PMID: 20535491.
62. Moore, Q. L., Majumder, M. A., Rutherford, L. K. & McGuire, A. L. Ethical and Legal Challenges Associated with Public Molecular Autopsies. *J Law Med Ethics* 44, 309–318 (2016).
63. Morentin, B., Ballesteros, J., Callado, L. F. & Meana, J. J. Recent cocaine use is a significant risk factor for sudden cardiovascular death in 15–49-year-old subjects: a forensic case–control study. *Addiction* 109, 2071–2078 (2014).
64. Morini, E., Sangiuolo, F., Caporossi, D., Novelli, G. & Amati, F. Application of Next Generation Sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death. *Front Genet* 6, 55 (2015).
65. Myerburg RJ, Castellanos A 1980; Taskforce on SD of ESC. *Eur Heart J* 2001; 22: 1374-1450
66. Nielsen, T. S., Hansen, J., Nielsen, L. P., Baandrup, U. T. & Banner, J. The presence of enterovirus, adenovirus, and parvovirus B19 in myocardial tissue samples from autopsies: an evaluation of their frequencies in deceased individuals with myocarditis and in non-inflamed control hearts. *Forensic Sci Med Pathol* 10, 344–350 (2014).
67. Niemeijer, M. N., van den Berg, M. E., Eijgelsheim, M., Rijnbeek, P. R. & Stricker, B. H. Pharmacogenetics of Drug-Induced QT Interval Prolongation: An Update. *Drug Saf* 38, 855–867 (2015).
68. Oliva, A. et al. State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death: *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 32, 1–16 (2011)
69. on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Archiv* 471, 691–705 (2017).
70. Onetti Muda A. Autopsia e formazione medica; *MEDIC* 2013; 21(1): 97-100100

71. Papadakis M, Sharma S, Cox S, Sheppard MN, Panoulas VF, Behr ER. The magnitude of sudden cardiac death in the young: a death certificate-based review in England and Wales. *Europace* 2009; 11:1353-1358
72. Peter J. Schwartz, Michael J. Ackerman, Alfred L. George, Arthur A.M. Wilde J *Am Coll Cardiol* 2013;62:169-180
73. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, et al. Task Force sulla morte cardiaca improvvisa, Società Europea di Cardiologia. *Ital Heart J Suppl* 2002; 3: 1051-65.
74. Priori, S. G. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* 36, 2793–2867 (2015).
75. Priori, S. G. et al. HRS/EHRA/APQRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm* 10, 1932–1963 (2013).
76. Recommendation no. R (99) 3 of the Committee of Ministers to member states on the harmonization of medico-legal autopsy rules. *Forensic Sci Int.* 2000; 111:5–58.
77. Risgaard B, Winkel BG, Jabbari R, Behr ER, Ingemann-Hansen O, Thomsen JL, et al. Burden of sudden cardiac death in persons aged 1 to 49 years: nationwide study in Denmark. *Circ Arrhythm Electro.* 2014; 7:205–11
78. Rizzo, S., Corrado, D., Thiene, G. & Basso, C. La morte cardiaca improvvisa nella donna. *G ITAL CARDIOL* 13, 8 (2012).
79. Saguner, A. M., Brunckhorst, C. & Duru, F. Arrhythmogenic ventricular cardiomyopathy: A paradigm shift from right to biventricular disease. *World Journal of Cardiology* 6, 154–174 (2014).
80. Sajantila, A., Palo, J. U., Ojanperä, I., Davis, C. & Budowle, B. Pharmacogenetics in medico-legal context. *Forensic Science International* 203, 44–52 (2010).
81. Salvaterra E, Lecchi L, Giovanelli S, Butti B, Bardella MT, Bertazzi PA, Bosari S, Coggi G, Coviello DA, Lalatta F, Moggio M, Nosotti M, Zanella A, Rebulli P. Banking together. A unified model of informed consent for biobanking. *EMBO Rep.* 2008; 9(4):307-13.

82. Sanchez, O. et al. Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation. *PLoS ONE* 11, e0167358 (2016).
83. Semsarian, C., Ingles, J. & Wilde, A. A. M. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European Heart Journal* 36, 1290–1296 (2015).
84. Spoonamore, K. G. & Ware, S. M. Genetic testing and genetic counseling in patients with sudden death risk due to heritable arrhythmias. *Heart Rhythm* 13, 789–797 (2016).
85. Stattin, E.-L. et al. Genetic screening in sudden cardiac death in the young can save future lives. *International Journal of Legal Medicine* 130, 59–66 (2016).
86. Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology S. G. Priori, E. Aliot, C. Blomstrom-Lundqvist, L. Bossaert, G. Breithardt, P. Brugada, A. J. Camm, R. Cappato, S. M. Cobbe, C. Di Mario, B. J. Maron, W. J. McKenna, A. K. Pedersen, U. Ravens, P. J. Schwartz, M. Trusz-Gluza, P. Vardas, H. J. J. Wellens and D. P. *European Heart Journal* (2001) 22, 1374– 1450.
87. Tester D.J., Ackerman M.J.; Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:240-246.
88. Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Cardiac channel molecular autopsy: insights from 173 consecutive cases of autopsy-negative sudden unexplained death referred for postmortem genetic testing. *Mayo Clin Proc* 2012; 87:524-39
89. Tester, D. J. & Ackerman, M. J. Evaluating the survivor or the relatives of those who do not survive: the role of genetic testing. *Cardiol Young* 27, S19–S24 (2017).
90. Thiene G, Corrado D, Basso C. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004; 25: 1772-5.
91. Thiene, G. et al. AECVP and SCVP 2009 Recommendations for Training in Cardiovascular Pathology. *Cardiovascular Pathology* 19, 129–135 (2010).
92. Thiene, G. et al. Postmortem Genetic Testing for Conventional Autopsy–Negative Sudden Unexplained Death: An Evaluation of Different DNA Extraction Protocols and the Feasibility of Mutational Analysis from Archival Paraffin-Embedded Heart Tissue. *American Journal of Clinical Pathology* 129, 391–397 (2008).

93. Thiene, G. Sudden cardiac death in the young: a genetic destiny? *Clin Med* 18, s17–s23 (2018).
94. Tominaga, M. et al. Efficacy of drug screening in forensic autopsy: Retrospective investigation of routine toxicological findings. *Legal Medicine* 17, 172–176 (2015).
95. Turnbull A, et al. *J Clin Pathol* 2015;68:601–604. doi:10.1136/jclinpath-2014-20270
96. van der Werf, C., van Langen, I. M. & Wilde, A. A. M. Sudden Death in the Young: What Do We Know About It and How to Prevent? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 3, 96–104 (2010).
97. Vecchio, M. D. & Padeletti, L. La morte cardiaca improvvisa in Italia. Dimensioni, percezioni, politiche ed impatto economico-finanziario. 9, 19 (2008).
98. Wilhelm M., Bolliger S. A. et. Al. Sudden cardiac death in forensic medicine – Swiss recommendations for a multidisciplinary approach, *Swiss Med Wkly.* 2015;145: w14129
99. Winkel BG, Holst AG, Theilade J, Kristensen IB, Thomsen JL, Ottesen GL, et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. *Eur Heart J.* 2011; 32:983–90
100. Wisten, A., Krantz, P. & Stattin, E.-L. Sudden cardiac death among the young in Sweden from 2000 to 2010: an autopsy-based study. *Europace* (2016).
101. Wolf SM, Lawrenz FP, Nelson CA, et al. Managing incidental findings in human subjects research: analysis and recommendations. *J Law Med Ethics.* 2008 Summer;36(2):219–48. 211
102. Yingying Tang, Jay Stahl-Herz, Barbara A. Sampson. Molecular diagnostics of cardiovascular diseases in sudden unexplained death, *Cardiovascular Pathology* 23 (2014) 1–4
103. Yuan, S.-M. Anomalous origin of coronary artery: taxonomy and clinical implication. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* (2014). doi:10.5935/1678-9741.20140109
104. Zachariassardóttir, S. et al. Sudden cardiac death and coronary disease in the young: A nationwide cohort study in Denmark. *International Journal of Cardiology* 236, 16–22 (2017).
105. Zipes, D. P. et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A

Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): Developed in Collaboration With the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 114, (2006).

Ringraziamenti

Il primo e speciale ringraziamento va alla Professoressa Susi Pelotti, relatrice di questa tesi, per la grande opportunità che mi ha offerto, per avermi permesso di approfondire un tema di così forte attualità e per la fiducia che ha sempre riposto in me. Dopo la laurea e la specializzazione mi ha accompagnata in questo nuovo stimolante percorso di studio, contagiandomi con il suo amore per la ricerca senza mai farmi mancare il suo sostegno e i suoi preziosi consigli.

Un grandissimo ringraziamento va alla Dottoressa Ornella Leone, il vero cuore del Progetto Morte Improvvisa giovanile, che in questa tesi ha avuto un ruolo fondamentale, per la disponibilità accordatami, per il prezioso aiuto scientifico e per gli impagabili suggerimenti.

Un ringraziamento ai miei genitori, che sono il mio punto di riferimento e che mi sono sempre stati a fianco, sopportandomi e supportandomi in ogni momento.

Vorrei infine ringraziare i miei amici e colleghi, ognuno di loro è stato fondamentale in questo mio percorso di vita e di studio. Vi voglio bene.