

# Autopsia molecolare nella morte improvvisa

Elisa Carturan, Cristina Basso, Gaetano Thiene

Sezione di Anatomia Patologica Speciale, Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Università degli Studi, Padova

**Key words:**  
Autopsy; Myocarditis;  
Mutational analysis;  
Sudden death.

Juvenile sudden death and sudden infant death syndrome exert a deep social impact, due to the young age of the victims and the unexpected occurrence of death. Recently, genetically determined ion channel diseases have been demonstrated to account for many forms of juvenile sudden death *sine materia* and also for some cases of sudden infant death syndrome (Brugada syndrome, long QT and short QT syndromes and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia). Moreover, a not negligible amount of juvenile sudden deaths are due to myocarditis as a consequence of cardiotropic viruses. Thus, it is now becoming mandatory to apply molecular pathology techniques also to the *post mortem* study of sudden death. In general, a long interval between death and *post mortem* exam and inadequate tissue sampling and preservation may increase the poor results of molecular investigation. The aim of this review was to provide evidence of the need to develop a molecular pathology investigation protocol to be used at *post mortem*.

(G Ital Cardiol 2007; 8 (12): 752-759)

© 2007 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 3 maggio 2007; nuova stesura il 20 luglio 2007; accettato il 23 luglio 2007.

Per la corrispondenza:

Dr.ssa Elisa Carturan

Sezione di Anatomia Patologica Speciale  
Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali  
Università degli Studi  
Via A. Gabelli, 61  
35121 Padova  
E-mail:  
elisa.carturan@unipd.it

## Introduzione

Metodiche di biologia molecolare vengono già utilizzate con successo nella patologia cardiovascolare moderna, dallo screening virale nello studio della biopsia endomiocardica all'analisi di mutazione per malattie cardiache geneticamente determinate<sup>1</sup>. Questa rassegna ha lo scopo di dimostrare l'utilità della biologia molecolare anche nella diagnosi di casi di morte improvvisa (MI) giovanile e di morte in culla (SIDS), evidenziando la necessità di mettere a punto un protocollo per lo studio molecolare *post mortem*<sup>2,3</sup>.

## Morte improvvisa giovanile

La MI è un evento naturale, inaspettato e fatale che avviene entro 1 h dalla presentazione dei sintomi in soggetti apparentemente sani<sup>4</sup>. L'incidenza della MI nei giovani è stata calcolata in circa 1-5/100 000/anno negli Stati Uniti e 0.9/100 000/anno in Italia (SIDS esclusa) e di 2.3/100 000/anno negli atleti<sup>5,6</sup>.

La MI può essere cerebrale, respiratoria o cardiovascolare. Nella nostra esperienza, basata sul Progetto di Studio della Morte Improvvisa Giovanile nella Regione Veneto, in circa l'81.5% dei casi la causa è di origine cardiovascolare, seguita da quella cerebrale (7.5%) e respiratoria (5%). Un

6% rimane inspiegato dopo un'analisi macro e microscopica<sup>2,3,7</sup>. Il meccanismo della MI è l'evento fisiopatologico terminale. Per lo più trattasi di MI elettrica (fibrillazione ventricolare, tachicardia ventricolare o asistolia), ma può trattarsi di MI meccanica quando si verifichi un improvviso impedimento alla progressione ematica (ad esempio, tamponamento cardiaco, embolia polmonare)<sup>3</sup>. Nel caso di MI elettrica, il substrato sottostante può essere rappresentato da patologie acquisite o congenite e l'evento precipitante (*trigger*) può consistere in stress psicofisici, emozioni, alterazioni elettrolitiche, assunzione di farmaci, ecc. Vi sono casi nei quali una completa analisi *post mortem* fallisce nell'identificare le cause di MI cardiaca. Essi vengono definiti come *mors sine materia* o fibrillazione ventricolare idiopatica.

Le cause di MI giovanile nel Veneto sono assai varie: aterosclerosi coronarica (21%), cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (14%), prolasso della valvola mitrale (12%), malattia delle coronarie non aterosclerotica (11%), miocardite (10%), difetti del sistema di conduzione (9%), cardiomiopatia ipertrofica (7%). Circa il 6% rimane inspiegato (MI idiopatica) e potrebbe essere correlato ad un'alterazione dei canali ionici di membrana su base genetica e come tale per la sua identificazione richiede un'indagine molecolare<sup>2,7</sup>. Nella Tabella 1<sup>2,8-17</sup> vengono riportate varie casistiche di MI gio-

**Tabella 1.** Morte improvvisa giovanile: prevalenza di miocardite e cuore normale.

| Autore                         | Intervallo temporale | Popolazione                                        | Età (anni) | Totale* | Miocardite (%) | Cuore normale (%) |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------|------------|---------|----------------|-------------------|
| Neuspiel e Kuller <sup>8</sup> | 1972-1980            | Allegheny County, USA                              | 1-21       | 80      | 17             | 36                |
| Topaz e Edwards <sup>9</sup>   | 1965-1985            | St. Paul, Minnesota, USA                           | 7-35       | 50      | 24             | 14                |
| Phillips et al. <sup>10</sup>  | 1965-1985            | Air Forces, USA                                    | 17-28      | 19      | 42             | 16                |
| Drory et al. <sup>11</sup>     | 1976-1985            | Israele                                            | 9-39       | 137     | 19             | 14                |
| Basso et al. <sup>2</sup>      | 1979-1999            | Veneto, Italia                                     | 1-35       | 273     | 10             | 6                 |
| Wisten et al. <sup>12</sup>    | 1992-1999            | Svezia                                             | 12-35      | 181     | 10.5           | 21                |
| Cho et al. <sup>13</sup>       | 1999-2000            | Corea                                              | <35        | 38      | 10.5           | 18                |
| Doolan et al. <sup>14</sup>    | 1994-2002            | New South Wales Sydney, Australia                  | <35        | 193     | 12             | 31                |
| Eckart et al. <sup>15</sup>    | 1977-2001            | Brooke Army Medical Center San Antonio, Texas, USA | 18-35      | 108     | 12             | 40                |
| Puranik et al. <sup>16</sup>   | 1995-2004            | Zona orientale di Sydney, Australia                | 5-35       | 241     | 12             | 29                |
| di Gioia et al. <sup>17</sup>  | 2001-2005            | Lazio, Italia                                      | 1-35       | 100     | 2              | 20                |

\* totale numero morti improvvise cardiovascolari con o senza substrato.

vanile con le diverse prevalenze di miocardite (da 2 a 42%) e cuore strutturalmente sano (da 6 a 40%). Questa variabilità probabilmente è dovuta alla mancata standardizzazione della definizione di MI giovanile (range di età, intervallo tra la presentazione dei sintomi e la morte) e a non uniformi protocolli e criteri diagnostici all'esame *post mortem*.

## Morte improvvisa in culla

La SIDS è un evento fatale e inaspettato che avviene in bambini di età <1 anno e rimane senza spiegazione dopo una completa indagine *post mortem* che prevede l'autopsia, lo studio della scena del decesso e l'analisi della storia clinica. In uno studio recente condotto nel nord Italia<sup>18</sup>, la SIDS risulta la prima causa di morte nel primo anno di vita dopo le prime settimane (>1 mese) e viene riportata un'incidenza variabile da 0.5 a 2 per mille nati vivi<sup>19-21</sup>. Nel 15-20% degli infanti morti improvvisamente si identifica la causa di morte allo studio *post mortem*, mentre nell'80-85% essa rimane inspiegata e questo gruppo viene chiamato SIDS. Diversi studi epidemiologici hanno cercato di identificare dei fattori di rischio (sesso maschile, età 2-4 mesi, nascita prematura, basso peso alla nascita, ecc.), ma attualmente il meccanismo precipitante nella SIDS rimane sconosciuto. Sono state proposte diverse teorie eziopatogenetiche (respiratoria, neurologica, metabolica e cardiaca)<sup>22</sup>. Nel 1976 Schwartz<sup>23</sup> propose la teoria nella quale ipotizzava che l'innervazione simpatica cardiaca potesse concorrere nella patogenesi della SIDS. Successivamente, lo stesso gruppo ha dimostrato che un prolungamento dell'intervallo QT nelle primissime settimane di vita è fortemente associato al rischio di SIDS, suggerendo così che lo screening elettrocardiografico alla nascita possa essere utile ai fini preventivi<sup>24</sup>.

Di interesse per l'indagine molecolare sono pertan-

to i casi di MI e SIDS causati da miocardite e malattie dei canali ionici geneticamente determinate.

## Miocardite

La miocardite viene definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come una malattia infiammatoria del miocardio associata a disfunzione cardiaca<sup>25</sup>. La modalità di esordio della malattia è piuttosto eterogenea: da forme paucisintomatiche a forme con improvviso scompenso cardiaco congestizio, da disturbi del ritmo a esordio fatale tipo MI.

Le cause di miocardite sono molte, comprendendo sostanze tossiche (antracicline, catecolamine), ipersensibilità a farmaci (antibiotici, diuretici tiazidici), ma le più frequenti sono le malattie infettive (virus, batteri, protozoi)<sup>26</sup>. Spesso c'è storia di recente sindrome influenzale e i sintomi di compromissione cardiaca possono essere lievi o assenti. La MI può sovvenire nella fase attiva della malattia o durante la fase di recupero, come conseguenza di un'aritmia ventricolare che si sviluppa in un substrato miocardico instabile dovuto all'infiltrato infiammatorio, all'edema interstiziale, alla necrosi miocitaria e alla fibrosi. Nella maggior parte dei casi, il cuore appare macroscopicamente normale e solo lo studio istologico eseguito in prelievi multipli a livello del setto, del ventricolo sinistro e destro, permette di identificare la miocardite come causa di MI. Se l'esame istologico rappresenta l'indagine più importante per la diagnosi di miocardite, esso non consente però il più delle volte di fornire una diagnosi eziologica. Raramente, infatti, sono evidenziabili effetti citopatici riconducibili ad un'infezione virale. L'introduzione delle tecniche di biologia molecolare ha permesso di identificare e caratterizzare in maniera sensibile e specifica la presenza di agenti infettivi.

In letteratura, la miocardite come causa di MI ha un'incidenza assai varia. Questa variabilità è dovuta sia alla diversa scelta dell'intervallo temporale tra i sintomi e l'esito fatale, sia al range di età e ai criteri diagno-

stici utilizzati (Tabella 1). Ad oggi, solo pochi studi hanno riportato l'indagine molecolare al fine di identificare l'eziologia infettiva nei casi di MI con diagnosi autoptica di miocardite. Il primo è stato lo studio condotto in 16 giovani *orienteeers* svedesi con MI e sono stati identificati rispettivamente 1 caso di *Chlamydia pneumoniae*, 2 di *Bartonella quintana* e 3 di *Bartonella henselae*<sup>27-29</sup>. In 2 giovani con MI durante esercizio fisico è stata ritrovata la presenza della *Rickettsia helvetica*: l'esame istologico mostrava una perimiodite e la presenza dell'agente infettivo nel cuore è stata evidenziata con colorazioni speciali (Gimenez, Giemsa e Grocott) e con analisi molecolare<sup>30</sup>. Successivamente Cioc e Nuovo<sup>31</sup>, utilizzando la tecnica dell'ibridazione *in situ* nello studio di 13 MI, identificarono la presenza di coxsackie virus B in 5 casi, rotavirus in 4 casi, HIV-1 virus in 2 casi, influenza A virus e influenza B virus in 1 caso, rispettivamente. Questa tecnica purtroppo può portare a falsi negativi, come recentemente dimostrato da Ishikawa et al.<sup>32</sup> in 2 casi autoptici dove sullo stesso campione l'ibridazione *in situ* per virus di Epstein-Barr risultava negativa, mentre l'analisi con la reazione a catena della polimerasi (PCR) risultava positiva dimostrandone la maggiore sensibilità.

Recentemente, Spanakis et al.<sup>33</sup> hanno descritto l'infezione enterovirale in 3 casi di miocardite fatale. Tutti i campioni mostravano segni di miocardite attiva e l'indagine immunoistochimica marcava positivamente per la famiglia delle proteine VP1 enterovirali e il genoma virale veniva amplificato con transcriptasi inversa e *nested* PCR e caratterizzato all'analisi di sequenza come coxsackie virus. Un nostro studio molecolare effettuato in una serie consecutiva di 30 MI da miocardite raccolti nel Registro Regionale Veneto della Morte Improvvisa Giovanile, ha evidenziato in 17 casi (65%) un'infezione virale. L'enterovirus è risultato l'agente infettivo più frequente (15.76%), isolato o associato ad altri virus<sup>34</sup>.

### Malattie cardiache non strutturali geneticamente determinate

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 MI<sup>35</sup>. L'instabilità elettrica è dovuta ad un'alterazione dei canali ionici di membrana cellulare o del reticolo sarcoplasmatico, identificabile solo con uno screening genetico. Di seguito vengono riportate le patologie che potrebbero essere alla base delle *mors sine materia* in percentuale variabile nelle diverse casistiche di MI giovanile (Tabella 1).

- **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. Le sincopi, tipiche manifestazioni della LQTS, spesso sono dovute a stress fisico o emozionale<sup>36</sup>. Sono state identificate due varianti fenotipiche: una autosomica

dominante chiamata sindrome di Romano-Ward<sup>37</sup> e una autosomica recessiva chiamata sindrome di Jervell-Lange-Nielsen<sup>38</sup> che si associa a sordità. In seguito a studi di *linkage* sono state identificate mutazioni in tre geni codificanti i canali del potassio e del sodio: KCNQ1 (LQT1)<sup>39</sup>, KCNH2 (LQT2)<sup>40</sup>, SCN5A (LQT3)<sup>41</sup> e successivamente in altri tre geni: KCNE1 (LQT5)<sup>42</sup>, KCNE2 (LQT6)<sup>43</sup> e SCN4B (LQT10)<sup>44</sup>. Sono state identificate anche mutazioni in una proteina strutturale, l'ankirina B (ANK B) (LQT4)<sup>45</sup> e in una proteina di membrana, la caveolina CAV3 (LQT9)<sup>46</sup>. Tutti questi geni sono coinvolti nella forma autosomica dominante, mentre in quella recessiva solo i geni KCNQ1 (LQT1) e KCNE1 (LQT5)<sup>47,48</sup>. Vi sono inoltre due varianti caratterizzate da prolungato intervallo QT e che si presentano come malattie multiorgano: sindrome di Andersen-Tawil, nella quale sono state identificate mutazioni nel gene KCNJ2 (LQT7)<sup>49</sup>, e la sindrome di Timothy, con mutazione nel canale del calcio CACNA1C (LQT8)<sup>50</sup>.

- **Sindrome del QT corto:** si presenta all'ECG di 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. Ad oggi sono state identificate mutazioni in tre geni codificanti per differenti canali del potassio: KCNH2, KCNQ1 e KCNJ2<sup>51-53</sup>.

- **Sindrome di Brugada:** è una malattia caratterizzata da alterazioni dell'ECG (sopraslivellamento non ischemico del tratto ST nelle precordiali V<sub>1</sub>-V<sub>3</sub> e blocco di branca destra)<sup>54</sup>. Sincope, tachicardia ventricolare, arresto cardiaco nel sonno sono spesso la prima presentazione di questa patologia<sup>55</sup>. Ad oggi sono state identificate mutazioni nel gene SCN5A codificante per il canale del sodio nel 25% dei casi<sup>56</sup>.

- **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. È stato identificato il difetto genetico a livello del recettore rianodinico di tipo 2 (RyR2)<sup>57</sup>. Il RyR2 è un canale del calcio tetrametrico, localizzato nel reticolo sarcoplasmatico. Le precise basi molecolari della disfunzione miocellulare rimangono controverse, ma si suppone che il recettore alterato si attiverebbe ad una più bassa concentrazione di calcio<sup>58</sup>. Una seconda variante autosomica recessiva (CPVT-2) è stata correlata a difetto genetico della calsequestrina di tipo 2 (CASQ2)<sup>59</sup>.

L'indagine genetica molecolare *post mortem* nella MI giovanile è stata effettuata per la prima volta nel 1999 da Ackerman et al.<sup>60</sup> in un caso di MI di una giovane donna di 19 anni, identificando una delezione nel gene del canale del potassio (KCNQ1-LQT-1). Nel 2004, Chugh et al.<sup>61</sup> eseguirono uno screening *post mortem* per i geni della LQTS (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2) in 12 casi di MI *sine mate-*

ria, cioè con cuore strutturalmente normale, pervenuti dal 1984 al 1996. Lo studio fu eseguito utilizzando DNA estratto da campioni autoptici fissati e inclusi in paraffina (FF-PET). In 2 casi gli autori identificarono mutazioni nel gene *KCNH2-LQT2*. Nello stesso anno sono stati pubblicati altri due studi molecolari *post mortem*: Di Paolo et al.<sup>62</sup> che indagarono 10 casi di MI giovanile per i geni *LQTS* utilizzando sempre materiale FF-PET, identificando mutazioni nel gene *KCNQ1-LQT1* in due individui e Tester et al.<sup>63</sup> che identificarono mutazioni del gene *RyR2* nel 14% di MI *sine materia*. In quest'ultimo caso l'indagine molecolare è stata eseguita utilizzando DNA estratto da sangue autoptico o da miocardio congelato. Successivamente, gli stessi autori hanno analizzato la stessa casistica di MI *sine materia* per otto geni implicati nella *LQTS* (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *ANK2*, *CACNA1C*) identificando otto mutazioni missenso (5 *KCNQ1-LQT1*, 2 *KCNH2-LQT2*, 1 *SCN5A-LQT3*) e due polimorfismi noti (*KCNH2-LQT2*, *SCN5A-LQT3*) dei quali è stata dimostrata la potenziale suscettibilità aritmica<sup>64,65</sup>. Complessivamente lo studio molecolare condotto nella serie di 49 MI *sine materia* evidenziava nel 35% dei casi una mutazione putativa dei canali ionici<sup>66</sup>. L'utilità dello screening *post mortem* è stata riportata anche da d'Amati et al.<sup>67</sup>, che identificarono una mutazione nel gene *RyR2* in un giovane con MI e una forma focale di cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro. Più recentemente, Creighton et al.<sup>68</sup> hanno riportato tre nuove mutazioni nel gene *RyR2* e una mutazione nota nel gene *KCNH-LQT1* nello studio genetico eseguito in 14 MI con cuore strutturalmente sano, utilizzando DNA estratto da tessuto congelato. Negativa è stata l'indagine condotta da Doolan et al.<sup>69</sup> per i geni *KCNQ1* e *SCN5A*, effettuata in 59 casi MI utilizzando DNA estratto da FF-PET.

Dal Registro Regionale Veneto della Morte Improvvisa Giovanile, sulla base di un normale ECG a 12 derivazioni e delle circostanze di morte (sforzo/emozione), sono stati selezionati 3 casi di MI *sine materia* per lo screening del gene *RyR2*. Solo in 1 caso è stato possibile effettuare lo screening genetico per il *RyR2*, direttamente dal tessuto archiviato congelato, identificando una mutazione puntiforme (A2387M)<sup>70</sup>. Nei rimanenti 2 casi era disponibile solo materiale fissato in FF-PET e l'analisi diretta non è stata possibile. Lo screening genetico dei familiari ha permesso comunque l'identificazione di altre due mutazioni del gene *RyR2* (N2392C, R420N)<sup>71</sup>.

Nella SIDS i primi geni investigati sono stati *KCNH2-LQT2* e *SCN5A-LQT3*, poiché queste due forme sono caratterizzate dalla presentazione dell'evento fatale a riposo<sup>72</sup>. Schwartz et al.<sup>73</sup> identificarono l'alterazione molecolare (S941N) nel gene *SCN5A-LQT3* in un neonato di 44 giorni con arresto cardiaco. L'intervento con defibrillazione presso il Pronto Soccorso dell'ospedale locale lo salvò dall'infausto epilogo. Questo episodio però non è propriamente una

SIDS, anche se in assenza del pronto intervento il neonato sarebbe sicuramente morto e l'analisi autoptica sarebbe risultata negativa. Il primo caso di vera e propria SIDS con diagnosi molecolare *post mortem* fu riportato da Schwartz et al.<sup>74</sup> nel 2001. Gli autori identificarono, in una neonata morta improvvisamente a 4 mesi, una mutazione nel gene *KCNQ1-LQT1* (P117L).

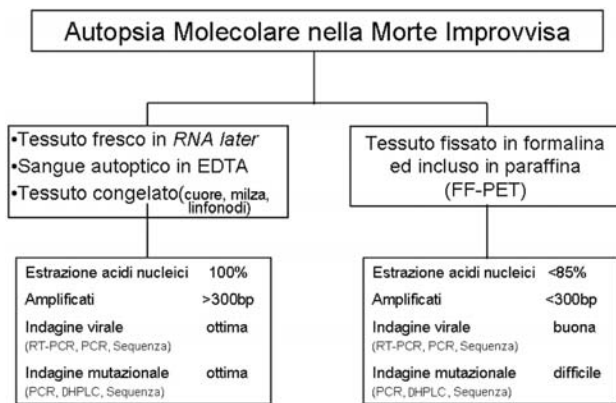
Nello stesso anno è stato riportato da Ackerman et al.<sup>75</sup> lo studio molecolare in una serie di 93 SIDS per il gene *SCN5A-LQT3*: in 2 neonati maschi sono state identificate due nuove mutazioni missenso nel gene *SCN5A-LQT3* (A997S e R1826H), responsabili del 2% delle SIDS. Successivamente, la suddetta coorte americana è stata analizzata anche per i geni *LQTS* del canale del potassio, riportando un 14 e un 29% di varianti nelle SIDS di razza bianca e nera rispettivamente, pur riconoscendo come sia virtualmente impossibile attribuire un ruolo patogenetico ad esse<sup>76</sup>. Nella casistica successivamente aggiornata a 134 casi sono state identificate anche tre diverse mutazioni nel gene della caveolina (V14L, T78M, L79R)<sup>77</sup>. In una recente casistica SIDS norvegese<sup>78</sup> di 201 casi di SIDS, investigati per i geni *LQTS*, è stata riportata un'incidenza del 9.5% di mutazioni (2 *KCNQ1*, 2 *KCNH2*, 4 *SCN5A*).

Infine sono state identificate mutazioni nel gene *RyR2* in pazienti con *LQTS* ed in casi di MI durante il sonno<sup>79,80</sup>. Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che alcune SIDS potessero essere dovute a mutazioni *RyR2*. L'indagine condotta da Tester et al.<sup>81</sup>, in una casistica di 134 SIDS, ha permesso l'identificazione di due mutazioni, per un'incidenza dell'1.5% (R2267H e S4565R).

### Protocollo di studio molecolare *post mortem*

Questi dati sottolineano l'importante ruolo che la patologia molecolare può giocare nell'identificare le cause di MI e SIDS e la necessità di seguire precisi protocolli per il prelievo e la conservazione di sangue e di tessuto in sede autoptica. L'autopsia nei casi di MI e SIDS viene in genere effettuata in seguito a precisa richiesta dell'autorità giudiziaria per escludere la possibilità di una morte non naturale e violenta. Non sono molti i centri di riferimento specializzati nello studio di MI cardiovascolare dove si esegue uno studio standardizzato del cuore che comprende l'analisi macroscopica, microscopica e molecolare.

Lo studio molecolare autoptico non è sempre possibile, poiché il lungo intervallo tra il decesso e il riscontro *post mortem* e la diversa tipologia di conservazione del tessuto possono precluderne la fattibilità. Per lo studio molecolare *post mortem* si possono avere campioni freschi e conservati in un liquido conservativo (RNA later), o congelati e conservati a -80° oppure FF-PET (Figura 1). L'RNA later è una soluzione acquosa, non tossica, che rapidamente penetra nel tessuto stabilizzando e proteggendo gli acidi nucleici. In tal



**Figura 1.** I campioni disponibili per l'analisi molecolare post mortem possono essere: sangue autoptico in EDTA, prelievi freschi e conservati in un liquido conservativo (RNA later) a 4°, congelati e conservati a -80° e/o fissati in formalina e inclusi in paraffina (FF-PET). L'approccio e la fattibilità dell'indagine molecolare risultano differenti a seconda del metodo conservativo del campione. DHPLC = cromatografia liquida ad alta prestazione denaturante; PCR = reazione a catena della polimerasi; RT-PCR = transcriptasi inversa e PCR.

modo si ovvia alla necessità di processare o congelare immediatamente il campione. Il tessuto deve essere di grandezza <0.5 cm per lato e deve essere immerso in un volume di RNA later pari a 5-10 volte le sue dimensioni.

Purtroppo la maggior parte dei campioni disponibili sono FF-PET, essendo questa la migliore tecnica di conservazione tissutale per lo studio istologico e immunistochimico, ma la processazione del campione durante la fissazione e l'inclusione possono portare ad una degradazione degli acidi nucleici che, se non ne precludono, ne limitano l'utilizzo. La ricerca e l'ottimizzazione dei metodi di estrazione degli acidi nucleici da materiale di archivio iniziò con il diffondersi dell'utilizzo delle tecniche molecolari nei laboratori di anatomia patologica.

Inizialmente l'applicazione è stata rivolta alla ricerca virale e all'analisi quali-quantitativa dell'espressione genica in campioni biotipici<sup>82,83</sup>. La grandezza del campione, il tipo di fissativo e il tempo trascorso sono le variabili che possono maggiormente inficiare l'analisi molecolare<sup>84</sup>. La lunghezza degli amplificati dovrebbe essere sempre <300 bp, questo per ovviare a possibili falsi negativi<sup>85</sup>. Nello studio molecolare post mortem si aggiunge un'altra variabile: il tempo trascorso tra il decesso, l'autopsia e il campionamento<sup>86</sup>.

Nell'analisi virale la grandezza degli amplificati può essere modificata disegnando coppie di primer specifiche per FF-PET e ricorrendo anche alla nested PCR che consiste in una seconda amplificazione con sonde più interne che aumenta la sensibilità dell'indagine. L'analisi di mutazione risulta meno modulabile e più esigente. I primer comunemente usati nei laboratori di genetica vengono disegnati nella porzione intronica, in modo da ottenere dei prodotti di PCR di grandezza variabile (200-600 bp) contenenti l'esone del gene in analisi.

Questi non sono utilizzabili nei campioni FF-PET e si rende necessario ridisegnarli per ottenere due o più frammenti più piccoli. La frammentazione risulta spesso difficile e inefficace, oltre ad aumentare i costi di analisi. Lo screening genetico utilizza l'analisi degli amplificati con metodica di cromatografia liquida ad alta prestazione denaturante (DHPLC). La DHPLC è una metodica automatica sensibile e specifica che consiste in una cromatografia ionica a fase inversa che, in condizioni di parziale denaturazione, permette di distinguere gli "etero" e "omoduplex" (combinazione tra un amplificato dell'allele normale-mutato o normale-normale dopo completa denaturazione). Successivamente, il sequenziamento genico permette di identificare l'esatta sostituzione nucleotidica nei campioni che hanno presentato un profilo anomalo. Purtroppo però impurità e sostanze inibenti spesso rendono difficile un'analisi di mutazione perché interferiscono con reazione di amplificazione, analisi cromatografica e la precisa lettura dell'elettroferogramma dell'analisi di sequenza. Al fine di identificare il miglior metodo di estrazione e purificazione per l'analisi di mutazione sono stati comparati diversi metodi di deparaffinazione, digestione e purificazione utilizzando campioni con età di conservazione diversa. Si è osservata una grande variabilità tra i metodi di estrazione e di purificazione e il kit commerciale MagneSil è risultato garantire il migliore risultato nell'amplificabilità e nell'analisi di mutazione per gli esoni critici del gene RyR2<sup>87</sup>.

D'altra parte, l'estrazione degli acidi nucleici da materiale autoptico congelato risulta sempre possibile e pertanto questo rappresenta il metodo ideale di prelievo e conservazione del tessuto ai fini di condurre indagini molecolari post mortem.

Si rende così necessario predisporre e diffondere precisi protocolli uniformi per il campionamento e la conservazione di sangue e tessuto autoptico, allo scopo di permettere uno studio molecolare post mortem, sia virale che genetico nei casi di MI e SIDS. A tale fine si dovrebbero sempre prelevare 5-10 ml di sangue in EDTA e 5 g di miocardio, milza o linfonodi, congelarli e conservarli a -80°. Alternativamente tali prelievi possono essere conservati a 4° in RNA later per pochi giorni, per poi farli pervenire al Centro di MI di riferimento. Tali indicazioni sono ora parte di un protocollo standardizzato di studio della MI giovanile proposto dall'Associazione Europea di Patologia Cardiovascolare (<http://anpat.unipd.it/aecvp/>)<sup>88</sup>. A ciò dovrebbe seguire l'identificazione di centri di riferimento (core lab) sia per lo studio autoptico che molecolare della MI e della SIDS a livello regionale e nazionale.

L'indagine molecolare post mortem può aiutare a ridurre ulteriormente i numeri di MI che rimangono senza spiegazione, nelle quali la diagnosi finale può essere ottenuta solo attraverso uno screening genetico, costituendo pertanto la base di partenza per uno screening clinico-genetico dei familiari, ai fini di una diagnosi precoce delle forme "occulte" e della prevenzione della MI<sup>89</sup>.

## Riassunto

La morte improvvisa giovanile e la morte improvvisa in culla hanno un profondo impatto sociale dovuto alla giovane età dei pazienti colpiti e alle circostanze repentine e inaspettate del decesso. Recentemente è stato dimostrato che le morti improvvise giovanili *sine materia* sono spesso dovute a mutazioni a livello di geni che codificano per i canali ionici (sindrome del QT lungo, del QT corto, di Brugada e della tachicardia ventricolare polimorfa catecolaminergica). Inoltre, una non trascurabile percentuale di morti improvvise giovanili è dovuta ad una miocardite di eziologia virale. Pertanto, l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare risulta fondamentale nello studio *post mortem* (autopsia molecolare). Il lungo intervallo di tempo che intercorre tra il decesso e il riscontro *post mortem* e la diversa tipologia di conservazione del tessuto possono però precludere la possibilità di effettuare un'indagine molecolare autoptica. Questa rassegna ha lo scopo di dimostrare l'utilità della diagnosi molecolare nei casi di morte improvvisa giovanile e di morte improvvisa in culla, evidenziando la necessità di mettere a punto un protocollo per lo studio molecolare *post mortem*.

**Parole chiave:** Analisi di mutazione; Autopsia; Miocardite; Morte improvvisa.

## Ringraziamenti

Questa rassegna è stata possibile grazie a: Registro Regionale della Patologia Cardio-Cerebro-Vascolare, Regione Veneto (Venezia), Ministero della Sanità (Roma), Telethon (Roma), Fondazione CARIPARO (Padova).

## Bibliografia

- Thiene G. Evolving role of cardiovascular pathology in clinical and surgical decision making. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129: 966-9.
- 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.
- Thiene G, Basso C, Corrado D. Cardiovascular causes of sudden death. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ, eds. *Cardiovascular pathology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2001: 326-74.
- Goldstein S. The necessity of a uniform definition of sudden coronary death: witnessed death within 1 hour of the onset of acute symptoms. *Am Heart J* 1982; 103: 156-9.
- Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med* 1998; 339: 364-9.
- Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1964-6.
- Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res* 2001; 50: 399-408.
- Neuspiel DR, Kuller LH. Sudden and unexpected natural death in childhood and adolescence. *JAMA* 1985; 254: 1321-5.
- Topaz O, Edwards JE. Pathologic features of sudden death in children, adolescents, and young adults. *Chest* 1985; 87: 476-82.
- Phillips M, Robinowitz M, Higgins JR, Boran KJ, Reed T, Virmani R. Sudden cardiac death in Air Force recruits. A 20-year review. *JAMA* 1986; 256: 2696-9.
- Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, et al. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* 1991; 68: 1388-92.
- Wisten A, Forsberg H, Krantz P, Messner T. Sudden cardiac death in 15-35-year olds in Sweden during 1992-99. *J Intern Med* 2002; 252: 529-36.
- Cho Y, Park T, Yang DH, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and sudden cardiac death in young Koreans. *Circ J* 2003; 67: 925-8.
- Doolan A, Langlois N, Semsarian C. Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust* 2004; 180: 110-2.
- Eckart RE, Scoville SL, Campbell CL, et al. Sudden death in young adults: a 25-year review of autopsies in military recruits. *Ann Intern Med* 2004; 141: 829-34.
- Puranik R, Chow CK, Duflo JA, Kilborn MJ, McGuire MA. Sudden death in the young. *Heart Rhythm* 2005; 2: 1277-82.
- di 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.
- Montomoli C, Monti MC, Stramba-Badiale M, et al. Mortality due to sudden infant death syndrome in Northern Italy, 1990-2000: a baseline for the assessment of prevention campaigns. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2004; 18: 336-43.
- Hoyert DL, Freedman MA, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics: 2000. *Pediatrics* 2001; 108: 1241-55.
- Sullivan FM, Barlow SM. Review of risk factors for sudden infant death syndrome. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001; 15: 144-200.
- Bayard RW, Cohle SD. Sudden death in infancy, childhood and adolescence. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994.
- Hauck FR, Hunt CE. Sudden infant death syndrome in 2000. *Curr Probl Pediatr* 2000; 30: 237-61.
- Schwartz PJ. Cardiac sympathetic innervation and the sudden infant death syndrome: a possible pathogenic link. *Am J Med* 1976; 60: 167-72.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, et al. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 1709-14.
- Richardson P, McKenna, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-2.
- Calabrese F, Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 11-25.
- Wesslen L, Pahlson C, Friman G, Fohlman J, Lindquist O, Johansson C. Myocarditis caused by *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and sudden unexpected death in a Swedish elite orienteer. *Lancet* 1992; 340: 427-8.
- Wesslen L, Pahlson C, Lindquist O, et al. An increase in sudden unexpected cardiac deaths among young Swedish orienteers during 1979-1992. *Eur Heart J* 1996; 17: 902-10.
- Wesslen L, Ehrenborg C, Holmberg M, et al. Subacute Bartonella infection in Swedish orienteers succumbing to sudden unexpected cardiac death or having malignant arrhythmias. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 429-38.
- Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 1999; 354: 1169-73.
- Cioc AM, Nuovo GJ. Histologic and in situ viral findings in the myocardium in cases of sudden, unexpected death. *Mod Pathol* 2002; 15: 914-22.
- Ishikawa T, Zhu BL, Li DR, Zhao D, Maeda H. Epstein-

- Barr virus myocarditis as a cause of sudden death: two autopsy cases. *Int J Legal Med* 2005; 119: 231-5.
33. Spanakis N, Manolis EN, Tsakris A, et al. Coxsackievirus B3 sequences in the myocardium of fatal cases in a cluster of acute myocarditis in Greece. *J Clin Pathol* 2005; 58: 357-60.
34. Basso C, Carturan E, Calabrese F, Thiene G. Molecular diagnosis of acute myocarditis causing sudden death in young people. (abstr) *Mod Pathol* 2005; 18: 57A.
35. Thiene G, Corrado D, Basso C. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J* 2004; 25: 1772-5.
36. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103: 89-95.
37. Romano C, Gemme C, Pongiglione R. Aritmie cardiache rare in età pediatrica. *Clin Ped* 1963; 45: 656-7.
38. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957; 54: 59-68.
39. Wang Q, Curran ME, Splawski I, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996; 12: 17-23.
40. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmias: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 795-803.
41. Dumaine R, Wang Q, Keating M, et al. Multiple mechanisms of Na<sup>+</sup> channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res* 1996; 78: 916-24.
42. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 1997; 17: 338-40.
43. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, et al. MiRP1 forms Ikr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; 97: 175-87.
44. Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, et al. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007; 116: 134-42.
45. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003; 421: 634-9.
46. Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, et al. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006; 114: 2104-12.
47. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 2005; 294: 2975-80.
48. Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, et al. The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation* 2006; 113: 783-90.
49. Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001; 105: 511-9.
50. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, et al. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004; 119: 19-31.
51. Brugada R, Hong K, Dumaine R, et al. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004; 109: 30-5.
52. Bellocq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, et al. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004; 109: 2394-7.
53. Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, et al. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005; 96: 800-7.
54. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 1391-6.
55. Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. *Lancet* 2000; 355: 808-9.
56. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; 392: 293-6.
57. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001; 103: 196-200.
58. Jiang D, Xiao B, Zhang L, Chen SR. Enhanced basal activity of a cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) mutant associated with ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res* 2002; 91: 218-25.
59. Lahat H, Pras E, Olender T, et al. A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1378-84.
60. Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ, Edwards WD. Molecular diagnosis of the inherited long-QT syndrome in a woman who died after near-drowning. *N Engl J Med* 1999; 341: 1121-5.
61. Chugh SS, Senashova O, Watts A, et al. Postmortem molecular screening in unexplained sudden death. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1625-9.
62. Di Paolo M, Luchini D, Bloise R, Priori SG. Postmortem molecular analysis in victims of sudden unexplained death. *Am J Forensic Med Pathol* 2004; 25: 182-4.
63. Tester DJ, Spoon DB, Valdivia HH, Makielski JC, Ackerman MJ. Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases. *Mayo Clin Proc* 2004; 79: 1380-4.
64. Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, et al. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* 2002; 297: 1333-6.
65. Fodstad H, Swan H, Laitinen P, et al. Four potassium channel mutations account for 73% of the genetic spectrum underlying long-QT syndrome (LQTS) and provide evidence for a strong founder effect in Finland. *Ann Med* 2004; 36 (Suppl 1): 53-63.
66. Tester D, Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 240-6.
67. d'Amati G, Bagattin A, Bauce B, et al. Juvenile sudden death in a family with polymorphic ventricular arrhythmias caused by a novel RyR2 gene mutation: evidence of specific morphological substrates. *Hum Pathol* 2005; 36: 761-7.
68. Creighton W, Virmani R, Kutys R, Burke A. Identification of novel missense mutations of cardiac ryanodine receptor gene in exercise-induced sudden death at autopsy. *J Mol Diagn* 2006; 8: 62-7.
69. Doolan A, Langlois N, Chiu C, Ingles J, Lind JM, Semsarian C. Postmortem molecular analysis of KCNQ1 and SCN5A genes in sudden unexplained death in young Australians. *Int J Cardiol* 2007, in press.
70. Carturan E, Michieli P, Bagattin A, et al. Diagnosi molecolare postmortem di mutazione nel gene RyR2 in giovane di 16 anni con arresto cardiaco da emozione: impatto diagnostico e preventivo nei familiari. (abstr) *G Ital Cardiol* 2006; 7 (Suppl 1-12): 114S.
71. Bauce B, Rampazzo A, Basso C, et al. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: early diagnosis of carriers. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 341-9.

72. Schwartz PJ. QT prolongation: from theory to evidence. In: Byard RW, Krous HF, eds. Sudden infant death syndrome: problems, progress and possibilities. London: Arnold, 2001: 83-95.
73. Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, et al. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; 343: 262-7.
74. Schwartz PJ, Priori SG, Bloise R, et al. Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* 2001; 358: 1342-3.
75. Ackerman MJ, Siu BL, Sturmer WQ, et al. Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 2001; 286: 2264-9.
76. Tester DJ, Ackerman MJ. Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc Res* 2005; 67: 388-96.
77. Cronk LB, Ye B, Kaku T, et al. Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* 2007; 4: 161-6.
78. Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, et al. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007; 115: 361-7.
79. Tester DJ, Kopplin LJ, Will ML, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2005; 2: 1099-105.
80. Allouis M, Probst V, Jaafar P, Schott JJ, Le Marec H. Unusual clinical presentation in a family with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to a G14876A ryanodine receptor gene mutation. *Am J Cardiol* 2005; 95: 700-2.
81. Tester DJ, Dura M, Carturan E, et al. A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm* 2007; 4: 733-9.
82. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167: 225-30.
83. Nuovo GJ, Silverstein SJ. Comparison of formalin, buffered formalin, and Bouin's fixation on the detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid from genital lesions. *Lab Invest* 1988; 59: 720-4.
84. Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl* 1991; 1: 46-50.
85. Stanta G, Schneider C. RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *Biotechniques* 1991; 11: 304-8.
86. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161: 1961-71.
87. Carturan E, Tester DJ, Thiene G, Ackerman MJ. Evaluation of different DNA extraction methods in archival heart tissue for postmortem mutational analysis. (abstr) *Lab Invest* 2006; 86 (Suppl): 325.
88. Basso C, Burke M, Fornes P, et al, on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv* 2007, in press.
89. Schwartz PJ, Crotti L. Can a message from the dead save lives? *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 247-9.