

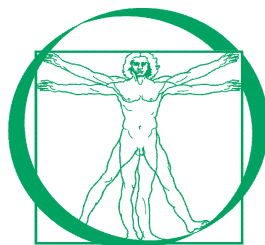
Indicizzata
in
BIOSIS Previews
EMBASE
SCOPUS
SCIENCE CITATION INDEX
EXPANDED (SciSearch)
con IMPACT FACTOR

MEDICINA DELLO SPORT

RIVISTA DELLA FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN FEDERATION
OF SPORTS MEDICINE ASSOCIATIONS

VOLUME 71 - N. 1 - MARZO 2018



F.I.M.S.I.

EDIZIONI MINERVA MEDICA

MEDICAL AREA

Molecular diagnosis of Brugada syndrome via next-generation sequencing of a multigene panel in a young athlete

Diagnosi molecolare di sindrome di Brugada in un giovane atleta mediante il sequenziamento di un pannello multigenico con tecniche di nuova generazione

Valeria D'ARGENIO^{1,2}, Maria V. ESPOSITO^{1,2}, Marcella NUNZIATO^{1,3}, Antonio DE SIMONE⁴, Pasqualina BUONO^{1,3}, Francesco SALVATORE^{1,2*}, Giulia FRISSEO^{1,2}

¹CEINGE-Advanced Biotechnology, Naples, Italy; ²Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Naples, Italy; ³Department of Motor Sciences and Wellness, University of Naples Parthenope, Naples, Italia; ⁴San Michele s.r.l. Nursing Home, Maddaloni, Caserta, Italy

*Corresponding author: Francesco Salvatore, CEINGE-Advanced Biotechnology, via Gaetano Salvatore 486, 80145 Naples, Italy. E-mail: salvator@unina.it

SUMMARY

Mutations in genes driving the molecular pathways that regulate myocardial functions can predispose to many independent cardiopathies and also to sudden cardiac death (SCD) even in asymptomatic subjects. The overlapping clinical signs or symptoms or even silent phenotypes make it difficult to diagnose these diseases, therefore the risk of undiagnosed disease could be high especially in young adults and athletes, which may then incur in SCD. We describe the case of a clinical asymptomatic eight-year-old child, practicing soccer game, who underwent a screening medical examination to undertake the path of an increasing physical activity to become a competitive athlete, where abnormal signs at ECG indicated a suspicion of an arrhythmogenic heart disease. Molecular screening analysis, to discriminate among the various predisposing gene alterations, was performed using a 75 gene-panel for arrhythmias customized in our laboratory. The child resulted carrier of a loss-of-function mutation in the *SCN5A* gene (c.1126C>T). About 25% of Brugada patients carry mutations in this gene coding for the cardiac sodium channel. The loss-of-function mutations in *SCN5A* gene induce alterations of sodium ion conduction in cardiomyocytes, compatible with the Brugada Syndrome. This case report highlights the importance of the implementation of a rapid, sensitive and wide molecular screening to shed light on possible genetic alterations present also in asymptomatic athletes with negative family history, which may often remain undiagnosed, thus exposed to high risk of sudden death.

(Cite this article as: D'Argenio V, Esposito MV, Nunziato M, De Simone A, Buono P, Salvatore F, et al. Molecular diagnosis of Brugada syndrome via next-generation sequencing of a multigene panel in a young athlete. Med Sport 2018;71:27-34. DOI: 10.23736/S0025-7826.18.03280-5)

KEY WORDS: Brugada syndrome - Genetic testing - Athletes.

RIASSUNTO

Le mutazioni nei geni che controllano i processi molecolari responsabili delle funzioni miocardiche possono predisporre a numerose e diverse cardiopatie e finanche alla morte cardiaca improvvisa (MCI), anche in soggetti asintomatici. La presenza di segni o sintomi comuni a differenti cardiopatie o persino la possibilità di fenotipi silenti possono rendere difficile la corretta diagnosi di queste malattie; pertanto, il rischio di una cardiopatia non diagnosticata in modo preciso può essere elevato, specialmente nei giovani adulti e negli atleti, che potrebbero quindi incorrere nella MCI. Descriviamo il caso di un giovane atleta, praticante calcio, in cui non era presente alcuna sintomatologia e che, al fine del rilascio dell'idoneità alla pratica sportiva agonistica, si è dovuto sottoporre ad indagini ad hoc. L'ECG effettuato in tale circostanza ha sollevato il sospetto di una cardiopatia aritmogena. È stato, pertanto, eseguito lo screening molecolare, per discriminare tra le differenti alterazioni genetiche predisponenti, utilizzando un pannello di 75 geni progettato nel nostro laboratorio per la diagnosi delle aritmie. L'atleta è risultato portatore di una mutazione nel

gene SCN5A (c.1126C>T), che comporta la perdita di funzione del canale cardiaco del sodio, proteina codificata dal gene SCN5A. Circa il 25% dei pazienti affetti da sindrome di Brugada presenta mutazioni in questo gene. Le mutazioni nel gene SCN5A con perdita di funzione inducono alterazioni della conduttanza del sodio a livello della membrana dei cardiomiociti, compatibili con la diagnosi di sindrome di Brugada. Questo caso clinico evidenzia l'importanza dell'esecuzione di uno screening molecolare dotato di un'elevata sensibilità diagnostica, e pertanto comprendente un numero di geni-malattia più alto possibile. Lo screening deve essere altresì sufficientemente rapido, tale da permettere di riconoscere possibili alterazioni genetiche presenti anche in soggetti asintomatici, eventualmente atleti e con storia familiare anche negativa. La mancata diagnosi di queste condizioni potrebbe esporre i portatori di mutazioni ad alto rischio di morte improvvisa.

PAROLE CHIAVE: *Sindrome di Brugada - Analisi genetica cardiaca - Atleti.*

Brugada syndrome (BrS) is a primary arrhythmogenic cardiac disease and is one of the main causes of sudden death in individuals under the age of 35 years not affected by structural heart disease.¹

It is diagnosed based on electrocardiogram (ECG) abnormalities, namely, an atypical right bundle branch block pattern with a characteristic coved-shaped ST elevation in leads V1 to V3, in the absence of structural heart disease, electrolyte disturbances or ischaemia.² However, the ECG pattern may be difficult to interpret and not specific to BrS. In fact, also patients suffering from arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy may have an ECG pattern of right bundle branch block and right precordial ST-segment elevation, which may be also present in other confounding arrhythmogenic cardiac diseases.

Brugada syndrome is usually transmitted as an autosomal dominant entity with incomplete penetrance, a family history being present in about 20% to 30% of patients. At least 21 genes have been identified as causative or modifier genes linked to BrS, which indicates a marked genetic heterogeneity in the pathogenesis of the disease.³ It is difficult to estimate the exact incidence of BrS in the general population, but its prevalence is reported to be 1 in 2000. Notably, the BrS-related ECG changes are dynamic and can vary spontaneously which also makes it more difficult to assess the exact incidence of this cardiopathy.^{1, 2}

In the last decade, next-generation sequencing (NGS) technologies have imposed new standards in the field of molecular diagnostics.⁴⁻⁶ Indeed, NGS-based strategies enable the analysis of DNA sequences up to entire genomes with a very high accuracy.^{4, 7} In particular, the analysis of panels of genes can now diagnose, at molecular level, genetically heterogeneous diseases, with possible translation to different phenotypic expression. This approach is not only able to simultaneously

La sindrome di Brugada (BrS) è una malattia cardiaca aritmogena primitiva ed è una delle principali cause di morte improvvisa in soggetti di età inferiore ai 35 anni, non affetti da cardiopatie strutturali.¹ La diagnosi, generalmente, è effettuata in presenza di specifiche anomalie dell'elettrocardiogramma (ECG), riferibili a blocco di branca destra, e soprasslivellamento del tratto ST con aspetto convesso "a tenda", di ampiezza ≥ 2 mm, nelle derivazioni da V1 a V3, in assenza di alterazioni morfologiche del cuore, disturbi elettrolitici o ischemia.² Tuttavia, l'aspetto dell'ECG può essere di difficile interpretazione e non specifico per BrS. Infatti, anche pazienti affetti da altre patologie cardiache aritmogeniche, quali la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro, possono presentare l'aspetto elettrocardiografico del blocco del branca destro con elevazione del segmento ST nelle derivazioni precordiali.

La sindrome di Brugada è una malattia ereditaria, generalmente trasmessa con modalità autosomica dominante e penetranza incompleta; infatti, una storia familiare positiva è presente in solo il 20-30% dei pazienti. Almeno 21 geni sono stati identificati come geni causativi o modificatori della BrS, evidenziando, quindi, una marcata eterogeneità genetica nella patogenesi della malattia.³ È difficile stimare l'esatta incidenza di tale sindrome nella popolazione generale, ma è riportata una prevalenza di 1 su 2000. In particolare, le alterazioni elettrocardiografiche correlate alla BrS sono dinamiche, potendo spontaneamente modificarsi e scomparire; questo aspetto rende ancora più difficile l'esatta valutazione dell'incidenza di questa cardiopatia.^{1, 2}

Nell'ultimo decennio, le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) hanno rivoluzionato il campo della diagnostica molecolare.⁴⁻⁶ Infatti, le strategie basate sulla NGS consentono l'analisi contemporanea di ampie regioni del DNA, fino a permettere il sequenziamento di interi genomi con un'accuratezza molto elevata.^{4, 7} In particolare, l'analisi di pannelli di geni consente attualmente di diagnosticare, a livello molecolare, malattie geneticamente eterogenee. Questo approccio

analyze several genes each related to a specific disease or to a group of confounding diseases, thereby increasing the diagnostic sensitivity of the molecular test, but is also able to simultaneously detect other genetic variations that may act as phenotypic modifiers,^{8,9} thereby providing additional information aiding the clinician in therapeutic decision. Various studies have described the use and efficacy of multigene panels in identifying the molecular basis of genetic cardiac disorders, including the spectrum of many arrhythmogenic diseases.^{6, 10-13}

In this context and in the attempt to overcome the possibility of clinical overlapping with other arrhythmogenic diseases and given the genetic heterogeneity of Brugada syndromes, we developed a targeted next-generation sequencing multigene panel, constituted by all the genes known to be implicated in primary arrhythmias and all the genes so far associated with the etiopathogenesis of Brugada syndrome and of closely related cardiac alterations that may be considered confounding diseases.

Case report

APR, an 8-year-old child, underwent competitive sport preparticipation screening to obtain eligibility to enter in active athlete soccer school. Screening included family and personal history, physical examination and 12-lead ECG as first-line evaluation. The child was completely asymptomatic and had unremarkable physical examination findings. There was no personal history of syncope. Family history was negative for sudden deaths; however his mother (34 years old) had suffered scattered episodes of ventricular tachycardia.

Standard ECG, however, showed sinus rhythm (98 bpm), left axial deviation, incomplete right bundle-branch block, and anomalies of ventricular repolarization. All these signs might be suggestive of Brugada syndrome. Because of the abnormal ECG features, the child underwent a further extensive work-up including 24-hour Holter monitoring, echocardiography, and myocardial magnetic nuclear resonance, which were normal.

To reach a closer asset of diagnosis, we used a targeted NGS of arrhythmia-related genes, included in the above described gene panel. The custom design was realized by us,

cio è, innanzitutto, capace di analizzare simultaneamente numerosi geni, ciascuno associato a una specifica malattia o ad un gruppo di malattie che si manifestano anche con fenotipi sovrapponibili, aumentando così la sensibilità diagnostica del test molecolare. D'altra parte, il sequenziamento NGS è anche in grado di rilevare contemporaneamente la presenza di variazioni genetiche che, sebbene non responsabili direttamente del fenotipo malattia, possono fungere da modificatori delle manifestazioni cliniche,^{8,9} fornendo in tal modo informazioni aggiuntive che possono aiutare il clinico nelle decisioni terapeutiche. Vari studi hanno descritto l'utilizzo e l'efficacia di pannelli multigenici nell'identificazione delle basi molecolari dei disordini cardiaci genetici, incluse molte malattie aritmogeniche.^{6,10-13}

In questo scenario, allo scopo sia di superare l'eterogeneità genetica della sindrome di Brugada sia di eseguire diagnosi differenziale tra la BrS e altre malattie aritmogeniche, abbiamo progettato un pannello multigenico, da analizzare mediante sequenziamento NGS, comprendente tutti i geni che ad oggi sono noti per essere implicati nelle genesi delle aritmie primitive, incluse la sindrome di Brugada e le alterazioni aritmiche cardiache che possono porre problemi di diagnosi differenziale.

Caso clinico

APR è un giovane atleta che è stato sottoposto ad approfondimento diagnostico per ottenere l'idoneità a svolgere attività sportiva agonistica presso una società di calcio. Lo screening ha incluso, in prima istanza, la raccolta dell'anamnesi familiare e personale, l'esame obiettivo e l'esecuzione dell'ECG a 12 derivazioni. Il bambino è risultato asintomatico e con esame obiettivo completamente nella norma. L'anamnesi personale era negativa per sincope; l'anamnesi familiare negativa per morte improvvisa; tuttavia la madre (34 anni) aveva sofferto di episodi sporadici di tachicardia ventricolare. L'ECG standard del giovane atleta, tuttavia, evidenziava ritmo sinusale (98 bpm), deviazione assiale sinistra, blocco di branca destra incompleto e anomalie della ripolarizzazione ventricolare. Questi segni elettrocardiografici potrebbero essere suggestivi di sindrome di Brugada. A causa delle anomalie dell'ECG, l'atleta è stato sottoposto ad analisi di secondo livello, comprendenti il monitoraggio Holter di 24 ore, l'ecocardiogramma e la risonanza magnetica nucleare cardiaca, che sono risultati nella norma.

Per pervenire alla diagnosi corretta è stata effettuata un'indagine molecolare che ha previsto il sequenziamento, mediante tecniche di nuova ge-

using the web-based HaloPlex SureDesign application (www.genomics.agilent.com). Our customized CanalPlus panel included 75 genes that resulted in 1780 target regions, 32,342 probes for a total of 776,794 bp. Genomic DNA was obtained from a peripheral blood sample using standard procedures. The NGS library was prepared using 250 ng of DNA processed through the HaloPlex Target Enrichment System (Agilent). Briefly, genomic DNA was enzymatically digested to obtain a pool of fragments that were enriched by hybridization with the mixture of the custom capture probes and amplified, thus obtaining an adapted sequencing library. Sequencing reactions were carried out on the MiSeq instrument (Illumina) using the PE 150x2 flow cell. Alignment, variant calling and filtering were performed using one of the pipelines used in our laboratory for NGS data analysis (SureCall software, Agilent, Figure 1). Thus, we obtained a list of annotated variants for further analysis based their clinical significance, frequency, effects at nucleotide and protein level, and prediction of pathogenicity. Pathogenetic variants were confirmed by Sanger sequencing.

The child resulted carrier of a mutation in the *SCN5A* gene (c.1126C>T, p.R376C; Figure 2), previously associated with sick sinus syndrome (SSS).¹⁴ The *SCN5A* gene encodes the α -subunit of the voltage-gated Nav1.5 sodium channel, which is responsible for regulating the rapid sodium current in cardiomyocytes. Mutations in this gene are related to the inherited cardiac channelopathies (BrS, SSS, long QT syndrome and progressive cardiac conduction disease) and to other inherited disorders characterized by structural alterations of the heart, namely, dilated cardiomyopathy.¹⁵ The c.1126C>T (p.R376C) mutation produces a loss of function of the cardiac sodium channel,¹⁶ which is compatible with the diagnosis of Brugada syndrome.

Accordingly, the child was disqualified from competitive sport activity and was advised to refrain from any physical exercise and to manage his fevers carefully, because a body temperature >38 °C in patients affected by Brugada syndrome can cause heart rhythm disturbances.^{17, 18} For prevention of malignant arrhythmias and sudden cardiac death events, the child was referred to receive implantable cardioverter defibrillator (ICD). Thereafter he has been put into a program of cardiological monitoring, until he reaches 14 years, to better

nerazione (NGS) di geni correlati all'aritmia, inclusi nel pannello di geni prima descritto. Il disegno del pannello di geni è stato realizzato presso il nostro laboratorio, utilizzando la piattaforma web HaloPlex SureDesign (www.genomics.agilent.com). Questo pannello personalizzato "CanalPlus" include 75 geni, che comprendono 1780 regioni bersaglio e 32.342 sonde, garantendo il sequenziamento di un totale di 776.794 bp. Il DNA genomico è stato estratto da un campione di sangue periferico, utilizzando procedure standardizzate. La libreria per NGS è stata preparata utilizzando 250 ng di DNA ed il sistema di arricchimento HaloPlex (Agilent). Brevemente, il DNA genomico è stato digerito mediante enzimi di restrizione, per preparare un pool di frammenti che sono stati arricchiti mediante ibridazione con la miscela delle sonde e successivamente amplificati, ottenendo così una libreria adatta per il sequenziamento. La reazione di sequenziamento è stata eseguita sulla strumentazione MiSeq (Illumina), utilizzando la flow cell di flusso PE 150x2. L'allineamento, l'annotazione e il filtraggio delle varianti sono stati effettuati utilizzando una delle piattaforme per l'analisi dei dati NGS disponibili nel nostro laboratorio (software SureCall, Agilent, Figura 1). Le varianti così ottenute sono state sottoposte a ulteriori valutazioni per definire il loro possibile significato clinico, in base alla frequenza nella popolazione, agli effetti prodotti a livello dell'acido nucleico e/o a livello proteico, nonché sulla base della predizione in silico di patogenicità. Le varianti che a seguito di questo processo di prioritizzazione sono state considerate patogenetiche sono state confermate mediante sequenziamento di Sanger.

*Il giovane atleta è risultato portatore di una mutazione nel gene *SCN5A* (c.1126C> T, p.R376C; Figura 2), precedentemente associata alla malattia del nodo del seno.¹⁴ Il gene *SCN5A* codifica la subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente Nav1.5, che è responsabile nei cardiomiociti della regolazione della corrente rapida in uscita di sodio. Le mutazioni in questo gene sono correlate alle canalopatie cardiache ereditarie (per esempio, sindrome di Brugada, malattia del nodo del seno, sindrome del QT lungo, difetto progressivo familiare della conduzione cardiaca), ma anche a disordini cardiaci ereditari caratterizzati da alterazioni strutturali del cuore, quali la cardiomiopatia dilatativa.¹⁵ La mutazione c.1126C> T (p.R376C) provoca una perdita di funzione del canale cardiaco del sodio,¹⁶ che è compatibile con la diagnosi della sindrome di Brugada.*

Il giovane atleta non ha ottenuto l'idoneità alla pratica dell'attività sportiva agonistica, gli è stato consigliato di astenersi dall'attività fisica intensa e

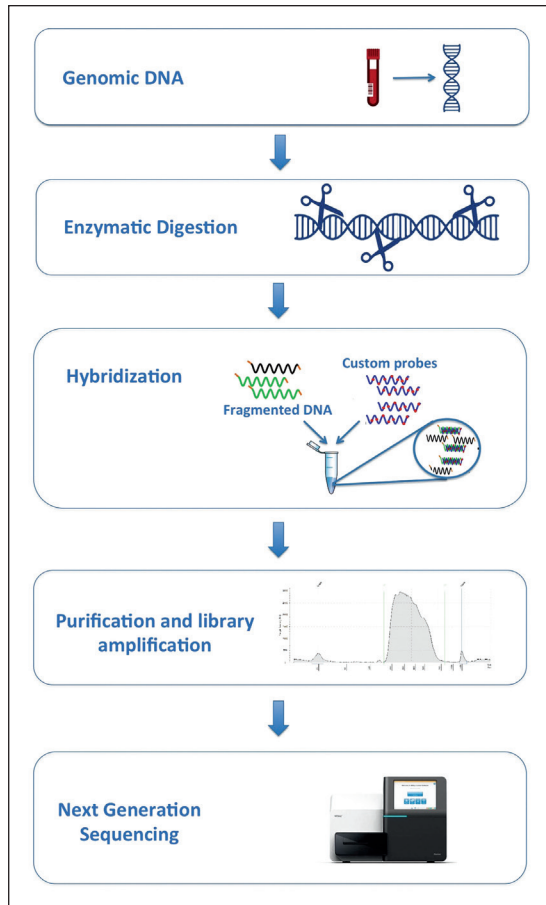


Figure 1.—Sample preparation flowchart. Genomic DNA has been obtained from peripheral blood sample and sheared into small fragments (ranging from 125 to 450 bp) by using a mixture of restriction enzymes. The obtained fragments have been hybridized with our custom probes to enrich the genes of interest. Enriched fragments have been amplified and quality checked before sequencing using the MiSeq system.

Figura 1. — Diagramma di flusso per la preparazione del campione. Il DNA genomico è stato estratto da un campione di sangue periferico ed è stato digerito in piccoli frammenti (da 125 a 450 bp) mediante l'utilizzo di una miscela di enzimi di restrizione. I frammenti ottenuti sono stati ibridizzati con una miscela di sonde, disegnate nel nostro laboratorio, per selezionare i geni di interesse. I frammenti arricchiti sono stati amplificati, sottoposti a controllo di qualità e successivamente sequenziati.

control any possible sign or symptom that may increase the risk of major complications.

Discussion

We describe the case of an asymptomatic young athlete who underwent cardiac clini-

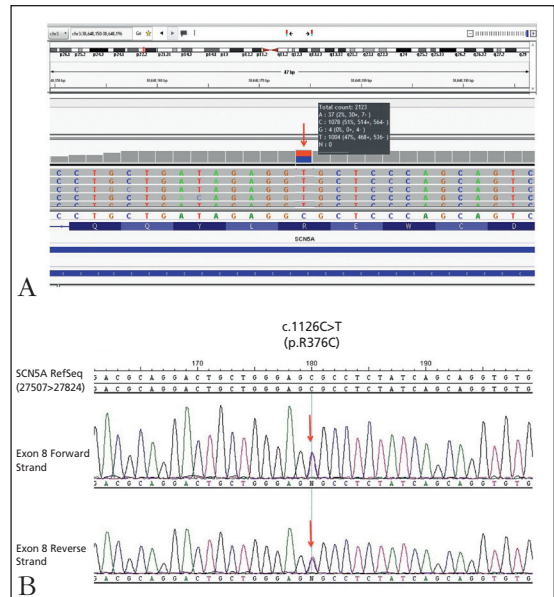


Figure 2.—Molecular analysis results. NGS-based genes panel analysis highlighted the presence in the analyzed child of the mutation c.1126C>T (p.R376C), in the SCN5A gene (A). The mutation was confirmed also by Sanger sequencing (B).

Figura 2. — Risultati dell'analisi molecolare. L'analisi del pannello di geni, basata su tecnologia NGS, ha evidenziato la presenza nel DNA del bambino analizzato della mutazione c.1126C>T (p.R376C), nel gene SCN5A (A). La mutazione è stata confermata anche con sequenziamento Sanger (B).

di gestire con attenzione i rialzi febbrili, poiché una temperatura corporea >38 °C in pazienti affetti da sindrome di Brugada può causare disturbi del ritmo cardiaco.^{17, 18} Nell'ottica della prevenzione delle aritmie maligne e della morte cardiaca improvvisa, il giovane atleta è stato sottoposto all'impianto del defibrillatore intra-cardiaco (ICD) ed è stato inserito in un programma di monitoraggio cardiologico, fino almeno al compimento del 14° anno di età, anche al fine della migliore gestione di qualsiasi segno/sintomo che potesse aumentare il rischio di complicanze maggiori.

Discussione

Il lavoro descrive il caso di un giovane atleta asintomatico sottoposto a indagini cardiache cliniche, strumentali e genetiche nell'ambito della partecipazione ad attività sportiva agonistica. Questo programma prevede, innanzitutto, l'esecuzione di un ECG standard, seguito da approfondimenti cardiologici strumentali nel caso si abbiano indizi per la presenza di una cardiopatia; il test molecola-

cal, instrumental and genetic investigations in the setting of preparticipation screening for competitive sport activity. In this setting, an ECG is first performed followed by other instrumental cardiological tests to verify the possible presence of cardiopathy; the molecular testing with a gene panel of 75 genes has been then performed to reach a closer diagnosis.

The athlete was definitively diagnosed by molecular analysis, which revealed a mutation in the *SCN5A* gene, compatible with the diagnosis of BrS, since it is known to be pathogenic.¹⁵ About 25% of patients affected by Brugada syndrome carry mutations in the gene coding for the sodium ion channel Nav1.5 in the cell membranes of the myocytes. The loss-of-function mutations in the *SCN5A* gene generally lead to Brugada syndrome by altering sodium ion conduction.¹⁸ About 600 mutations in the *SCN5A* gene have been reported to date, one-half of which produce pathogenetic mechanisms compatible with Brugada syndrome.

The main diagnostic problem in Brugada syndrome is the overlapping with other arrhythmogenic syndromes, such as the early repolarization syndrome or the arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. A significant overlap in clinical features and in ECG signs has been widely demonstrated in these conditions.¹⁹⁻²² Thanks to the simultaneous analysis of multiple genes by means of next-generation sequencing it is now possible to help the discrimination between these overlapping clinical phenotypes. Consequently, we recommend that molecular analysis by *ad hoc* genetic panels be included in sport preparticipation screening, when familial asset is present or when symptoms and instrumental signs of cardiac dysfunction may be suggestive of cardiac disease. The identification, through this analytical approach, of a pathogenetic variant in the *SCN5A* gene, associated with the electrocardiographic findings, led in this case to the diagnosis of Brugada syndrome in a young asymptomatic athlete, who was thus excluded from competitive sports activity and was allowed to receive ICD. The main clinical problem in Brugada syndrome is the indeterminate and unpredictable risk of sudden cardiac death due to malignant tachyarrhythmias, occurring typically and tragically also in healthy young subjects, as first described by the Brugada brothers in

re da noi selezionato, mediante il sequenziamento di un pannello di 75 geni, è stato anche eseguito per pervenire alla diagnosi di precisione.

Il giovane atleta è stato così diagnosticato definitivamente mediante l'analisi molecolare, che ha rivelato la presenza di una mutazione nel gene SCN5A, precedentemente descritta come patogenetica¹⁵ e, pertanto, compatibile con la diagnosi di BrS. Circa il 25% dei pazienti affetti dalla sindrome di Brugada presenta mutazioni nel gene codificante il canale del sodio Nav1.5 presente nel sarcolemma dei cardiomiociti. Le mutazioni nel gene SCN5A che producono perdita di funzione della corrispondente proteina generalmente causano la sindrome di Brugada, alterando la conduttanza degli ioni sodio.¹⁸ Ad oggi sono state descritte circa 600 mutazioni nel gene SCN5A, metà delle quali produce meccanismi patogenetici compatibili con la sindrome di Brugada.

Un importante problema diagnostico nella sindrome di Brugada è la difficoltà di diagnosi differenziale rispetto ad altre sindromi aritmogeniche, come la sindrome da ripolarizzazione precoce o la cardiomiopatia ventricolare destra aritmogenica. Una significativa sovrapposizione delle manifestazioni cliniche e dei segni elettrocardiografici è stata ampiamente riportata tra queste patologie.¹⁹⁻²² L'analisi simultanea di più geni mediante sequenziamento di nuova generazione consente, attualmente, di discriminare tra fenotipi clinico-strutturali in alcuni casi sovrapponibili. Pertanto, noi raccomandiamo che l'analisi molecolare di pannelli di geni progettati ad hoc sia inclusa nello screening di prepartecipazione all'attività sportiva agonistica, particolarmente quando è presente un'anamnesi familiare positiva per cardiopatie ereditarie o familiari e/o per morte improvvisa, o quando sintomi e segni di disfunzione cardiaca "borderline" possono essere indicativi della presenza di una malattia cardiaca non meglio identificata. Il riscontro, attraverso questo approccio analitico, di una variante patogenetica nel gene SCN5A, associata ai dati elettrocardiografici, ha portato nel nostro caso alla diagnosi della sindrome di Brugada in un giovane atleta asintomatico, che è stato quindi escluso dall'attività sportiva agonistica ed è stato indirizzato all'impianto di un defibrillatore. Il principale problema clinico nella gestione del paziente affetto da sindrome di Brugada è il rischio, indeterminato e imprevedibile, di morte cardiaca improvvisa, dovuta a tachiaritmie maligne, che si verificano tipicamente e tragicamente anche in soggetti giovani apparentemente sani, come descritto dai fratelli Brugada nel 1992.²³ Al contrario, il rischio di morte improvvisa è ridotto negli atleti affetti da aritmie ereditarie se essi si astengono dalla

1992.²³ On the contrary, the risk of sudden death is reduced in athletes who refrain from these activities.^{24, 25} Furthermore, the potential impact of hyperthermia generated by physical activity indicates (see ESC document)²⁶ that all Brugada patients, including asymptomatic subjects and gene carriers without the phenotype, must not participate in competitive sport.

Conclusions

In conclusion, the genetic analysis of a set of multiple genes for the screening of molecular alterations is a necessary complementation to a clinical and instrumental cardiological approach in order to reach the most correct diagnosis. This case report, therefore, highlights the importance of the implementation of a rapid, sensitive and wide molecular screening in order to identify genetic alterations present also in asymptomatic athletes, who often remain undiagnosed.

pratica dell'attività sportiva.^{24, 25} Negli atleti affetti da BrS molto importante per la genesi di aritmie maligne è anche l'impatto dell'ipertermia generata dall'attività fisica (vedi documento ESC).²⁶ Pertanto, tutti i pazienti affetti da sindrome di Brugada, compresi i soggetti clinicamente asintomatici ma portatori di mutazione genetica, devono essere esclusi dalle competizioni sportive.

Conclusioni

In conclusione, l'analisi genetica basata sul sequenziamento di un pannello multiplo di geni è un necessario complemento alla valutazione cardiologica clinica e strumentale, al fine di pervenire alla diagnosi definitiva. La descrizione di questo caso clinico, pertanto, evidenzia l'importanza dell'implementazione di uno screening molecolare rapido ma contemporaneamente ampio e sensibile, per identificare le alterazioni genetiche presenti anche in soggetti asintomatici, che possono, altrimenti, rimanere non diagnosticate, esponendo gli atleti geneticamente predisposti al rischio della morte improvvisa.

References/Bibliografia

- 1) Kusumoto FM, Bailey KR, Chaouki AS, Deshmukh AJ, Gautam S, Kim RJ, *et al.* Systematic Review for the 2017 AHA/ACC/HRS Guideline 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 on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm* 2017 Nov 3 [Epub ahead of print].
- 2) Curcio A, Santarpia G, Indolfi C. The Brugada Syndrome- From Gene to Therapy. *Circ J* 2017;81:290-7.
- 3) Juang JJ, Horie M. Genetics of Brugada syndrome. *J Arrhythm* 2016;32:418-25.
- 4) Precone V, Del Monaco V, Esposito MV, De Palma F, Ruocco A, Salvatore F, *et al.* Cracking the code of human diseases using next-generation sequencing: applications, challenges and perspectives. *Biomed Res Int* 2015;2015:161648.
- 5) D'Argenio V, Esposito MV, Telese A, Precone V, Starnone F, Nunziato M, *et al.* The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: Next-generation sequencing supersedes conventional approaches. *Clin Chim Acta* 2015;446:221-5.
- 6) D'Argenio V, Frisso G, Precone V, Boccia A, Fienga A, Pacileo G, *et al.* DNA sequence capture and next generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *J Mol Diagn* 2014;16:32-44.
- 7) D'Argenio V, Notomista E, Petrillo M, Cantello P, Cafaro V, Izzo V, *et al.* Complete sequencing of *Novosphingobium* sp. PPIY reveals a biotechnologically meaningful metabolic pattern. *BMC Genomics* 2014;15:384-97.
- 8) Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, *et al.* Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 2009;302:1076-83.
- 9) Sanna V, Zarrilli F, Nardiello P, D'Argenio V, Rocino A, Coppola A, *et al.* Mutational spectrum of F8 gene and prothrombotic gene variants in haemophilia A patients from Southern Italy. *Haemophilia* 2008;14:796-803.
- 10) Leong IUS, Stuckey A, Belluocchio D, Fan V, Skinner JR, Prosser DO, *et al.* Massively Parallel Sequencing of Genes Implicated in Heritable Cardiac Disorders: A Strategy for a Small Diagnostic Laboratory. *Med Sci (Basel)* 2017;5:22.
- 11) Cecconi M, Parodi MI, Formisano F, Spirito P, Autore C, Musumeci MB, *et al.* Targeted next-generation sequencing helps to decipher the genetic and phenotypic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Mol Med* 2016;38:1111-24.
- 12) Forleo C, D'Erchia AM, Sorrentino S, Manzari C, Chiara M, Iacoviello M, *et al.* Targeted next-generation sequencing detects novel gene-phenotype associations and expands the mutational spectrum in cardiomyopathies. *PLoS One* 2017;12:e0181842.
- 13) Girolami F, Frisso G, Benelli M, Crotti L, Iacone M, Mango R, *et al.* Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2018;19:1-11.
- 14) Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2015;1854:1502-9.
- 15) Detta N, Frisso G, Limongelli G, Marzullo M, Calabrò R, Salvatore F. Genetic analysis in a family affected by sick sinus syndrome may reduce the sudden death risk in a young aspiring competitive athlete. *Int J Cardiol* 2014;170:63-5.
- 16) Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Vatta M, Nesterenko DV, Nesterenko VV, *et al.* Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ Res* 1999;85:803-9.
- 17) Mizusawa Y, Morita H, Adler A, Havakuk O, Thollet A, Maury P, *et al.* Prognostic significance of fever-induced Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2016;13:1515-20.
- 18) Sarquela-Brugada G, Campuzano O, Arbelo E, Brugada J, Brugada R. Brugada Syndrome: clinical and genetic findings. *Genet Med* 2016;18:3-12.
- 19) Conte G, Caputo ML, Regoli F, Moccetti T, Brugada P, Auricchio A. Brugada Syndrome and Early Repolarisation: Distinct Clinical Entities or Different Phenotypes of the Same Genetic Disease? *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2016;5:84-9.
- 20) Corrado D, Basso C, Buja G, Nava A, Rossi L, Thiene G. Right bundle branch block, right precordial ST-segment elevation, and sudden death in young people. *Circulation* 2001;103:710-7.
- 21) Hoogendijk MG. Diagnostic Dilemmas: Overlapping Features of Brugada Syndrome and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Front Physiol* 2012;3:144.
- 22) Kataoka S, Serizawa N, Kitamura K, Suzuki A, Suzuki T, Shiga T, *et al.* An overlap of Brugada syndrome and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *J Arrhythm* 2016;32:70-3.
- 23) 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.

24) Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does sport activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1959-63.

25) Thompson PD, Franklin BA, Balady GJ, Blair SN, Corrado D, Estes NA, *et al.* Exercise and acute cardiovascular

events: placing the risks into perspective. Scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Clinical Cardiology. In collaboration with the American College of Sports Medicine. *Circulation* 2007;115:2358-68.

26) Pelliccia A, Fagard R, Bjørnstad HH, Anastassakis A, Arbustini E, Assanelli

D, *et al.* Recommendations for competitive sports participation in athletes with cardiovascular disease. A consensus document from the Study Group of Sports Cardiology of the Working Group of Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology, and the Working Group of Myocardial and Pericardial diseases of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26:1422-45.

Authors' contributions.—Valeria D'Argenio and Maria V. Esposito equally contributed.

Funding.—The study was supported by grants PON03PE_00060_2 and PON03PE_00060_7 (Campania - Bioscience) from the Italian Ministry of University and Research (to F.S.).

Conflicts of interest.—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Acknowledgments.—The authors thank Jean Ann Gilder (Scientific Communication srl., Naples, Italy) for writing assistance, Vittorio Lucignano (CEINGE-Biotecnologie Avanzate) for technical assistance and Serena Conato (CEINGE-Biotecnologie Avanzate) for her support in some experimental procedures.

Manuscript accepted: February 23, 2018. - Manuscript received: February 1, 2018.