

Valutazione dell'ereditarietà e analisi molecolare alla luce delle nuove linee guida europee sulla cardiomiopatia ipertrofica

Francesca Brun¹, Luisa Mestroni², Gianfranco Sinagra¹

¹Dipartimento Cardiovascolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti", Trieste

²Cardiovascular Institute, University of Colorado Denver AMC, Aurora, Colorado, USA

G Ital Cardiol 2015;16(3):138-142

INTRODUZIONE

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è la più frequente patologia cardiovascolare su base ereditaria. La stratificazione del rischio di morte improvvisa rappresenta un passaggio cruciale e importante per identificare correttamente i pazienti con CMI.

Le nuove linee guida europee sulla CMI¹ pongono l'accento sulla necessità per il paziente di una "cura individualizzata nell'arco della vita" e sottolineano come un'attenta valutazione del paziente sia utile al fine di poter formulare una corretta diagnosi e identificare i familiari a rischio. L'attenta analisi della famiglia, con una raccolta delle informazioni riguardanti i familiari, è fondamentale per disegnare un accurato albero genealogico, poter fornire una consulenza genetica e guidare i test genetici e molecolari.

Le tecnologie di ultima generazione, come il *high-throughput next generation sequencing* (NGS), sono in grado di analizzare l'intero esoma o genoma, con costi e precisione sostanzialmente simili ai metodi di sequenziamento tradizionale, rendendo l'analisi genetica possibile nella pratica clinica. Indipendentemente dalla metodologia di sequenziamento impiegata, la ricerca di mutazioni nella CMI dovrebbe includere i geni delle proteine sarcomeriche più comunemente implicati. Inoltre, nei pazienti con caratteristiche fenotipiche suggestive di specifiche malattie genetiche, dovrebbe essere avviata una ricerca razionale per mutazioni patogene in altri geni.

Il documento della Società Europea di Cardiologia (ESC) ha adottato il sistema di classificazione delle cardiomiopatie proposto nel documento di consenso ESC del 2013². Nello statement le cardiomiopatie sono definite da specifici criteri morfologici e funzionali e vengono suddivise in genetiche/familiari e non genetiche/non familiari, indipendentemente dalla presenza di malattia extracardiaca³. Si stima che la prevalenza sia tra lo 0.2% e lo 0.23%⁴.

EZIOLOGIA DELLA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA

Questa patologia è causata da mutazione dei geni che codificano per proteine del sarcomero in circa il 60% dei casi ed è trasmessa in modo autosomico dominante. Nel 5-10% dei casi l'ipertrofia ventricolare sinistra trova origine in una serie di altre patologie infiltrative (es. amiloidosi), metaboliche (es. malattia di Fabry) o sindromi (es. sindrome di Noonan), che si presentano con un quadro spesso sovrapponibile alla CMI. Nel documento appena presentato, si sottolinea come una valutazione multidisciplinare e l'identificazione di "red flags" ("segnali di allarme" o elementi clinici suggestivi per la diagnosi) siano step indispensabili per la diagnosi differenziale e quindi per la gestione terapeutica².

MUTAZIONI A CARICO DEI GENI CHE CODIFICANO PER LE PROTEINE SARCOMERICHE

Le mutazioni a carico dei geni che codificano per la catena pesante della beta-miosina (MYH7) e per la proteina C che lega la miosina (MYBPC3) costituiscono le varianti più frequenti (circa il 70%). Meno comuni sono le mutazioni a carico dei geni che codificano per la troponina cardiaca I e T (TNNI3, TNNT2), la catena alfa-tropomiosina (TPM1) e la catena leggera 3 della miosina (MYL3). Alcuni studi hanno dimostrato che i pazienti con mutazioni a carico delle proteine sarcomeriche manifestano la malattia in età più precoce e hanno una più alta incidenza di storia familiare di CMI e morte improvvisa cardiaca, rispetto a quelli senza una mutazione identificata^{5,6}. Inoltre tendono a manifestare un'ipertrofia più severa, disfunzione microvascolare e fibrosi miocardica⁷. I dati pubblicati sul valore prognostico delle mutazioni relative ad alcune proteine sarcomeriche non sono conclusivi: si tratta di studi osservazionali basati su piccoli gruppi di pazienti e spesso con risultati non riproducibili, risentendo della rarità delle mutazioni⁸⁻¹⁰. I dati che sono emersi recentemente suggeriscono che multiple mutazioni a carico dei geni sarcomeriche sono presenti in circa il 5% degli individui, che tendono a manifestare la malattia in età più precoce e con un fenotipo più severo^{10,11}.

La diagnosi differenziale è utile per distinguere la CMI da altre forme di ipertrofia cardiaca e guidare la ricerca genetica. Disordini metabolici (malattia di Anderson-Fabry, sindrome PRKAG2), mitocondriopatie, malattie neuromuscolari (atassia di Friedreich), sindromi malformative (sindrome LEOPARD, Costello) e malattie infiltrative (amiloidosi) sono tutte causa di ipertrofia ventricolare sinistra e vanno considerate in presenza di fenotipi suggestivi.

© 2015 Il Pensiero Scientifico Editore

Ricevuto 09.12.2014; accettato 16.12.2014.

Gli autori dichiarano nessun conflitto di interessi.

Le opinioni espresse in questo articolo non riflettono necessariamente quelle dell'Editor del Giornale Italiano di Cardiologia.

Per la corrispondenza:

Prof. Gianfranco Sinagra Dipartimento Cardiovascolare, Ospedale di Cattinara, Via P. Valdoni 1, 34149 Trieste
e-mail: gianfranco.sinagra@aots.sanita.fvg.it

SCREENING FAMILIARE

La maggior parte dei casi di CMI è trasmessa in modo autosomico dominante, con un rischio di trasmissione ai figli del 50%¹². Alcuni casi sono spiegati da mutazioni *de novo*, ma apparentemente casi sporadici possono essere presenti per la penetranza incompleta. I disordini metabolici hanno frequentemente una trasmissione autosomica recessiva o legata al cromosoma X. Una mutazione patogena viene identificata in circa il 60% dei casi^{12,13}. La probabilità di trovare una mutazione causale è più alta nei pazienti con malattia familiare e più bassa nei pazienti più anziani e negli individui con caratteristiche non classiche.

LA CONSULENZA GENETICA NEI PROBANDI

La consulenza genetica "clinica" nei pazienti con CMI è raccomandata nei casi in cui l'ipertrofia non sia spiegata da sole cause non genetiche. Deve essere fatta da professionisti che lavorano in team multidisciplinari in grado di supportare i pazienti nella comprensione della malattia e nella gestione delle implicazioni psicosociali, professionali, etiche e legali della malattia¹⁴⁻¹⁶. La consulenza genetica facilita anche la raccolta di informazioni provenienti da altri membri della famiglia, compresi i sintomi, gli eventuali dati autoptici al fine di costruire gli alberi familiari. L'analisi dei pedigree aiuta a determinare la probabilità di malattia familiare e la verosimile modalità di ereditarietà, fornendo indizi per l'eziologia sottostante².

Le conseguenze di un eventuale test positivo per il paziente e i suoi familiari devono essere spiegate. Per questo motivo, i test genetici sono raccomandati nei pazienti che soddisfano i criteri diagnostici per CMI¹⁷, per consentire lo screening genetico a cascata nei loro familiari. Il test genetico può essere di valore clinico limitato, quando parenti di primo grado non sono disponibili o non sono disposti a prendere in considerazione lo screening per la malattia (Tabella 1).

Tabella 1. Quando eseguire il test genetico sui probandi.

| Raccomandazioni | Classe ^a | Livello ^b |
|---|---------------------|----------------------|
| Il test genetico è raccomandato nei pazienti che soddisfano i criteri diagnostici per CMI quando permette uno screening genetico "a cascata" dei loro familiari. | I | B |
| È raccomandato che il test genetico sia eseguito in laboratori diagnostici certificati da esperti nell'interpretazione delle mutazioni associate alle cardiomiopatie. | I | C |
| In presenza di segni e sintomi suggestivi per CMI quale specifica causa di malattia, il test genetico è raccomandato per confermare la diagnosi. | I | B |
| Il test genetico in pazienti con diagnosi borderline ^c di CMI deve essere eseguito solo dopo accurata valutazione da parte di un team di esperti. | Ila | C |
| L'analisi genetica <i>post-mortem</i> di tessuto o DNA deve essere presa in considerazione nei pazienti deceduti con riscontro anatomo-patologico di CMI per consentire uno screening "a cascata" dei loro familiari. | Ila | C |

CMI, cardiomiopatia ipertrofica.

^a classe di raccomandazione; ^b livello di evidenza; ^c borderline: spessore parietale del ventricolo sinistro 12-13 mm negli adulti; ipertrofia ventricolare sinistra in soggetti ipertesi, allenati, o affetti da patologia valvolare.

Adattata da Elliott et al.¹.

Il test genetico può contribuire ad individuare soggetti con diagnosi clinica incerta (es. atleti e ipertesi) e deve essere eseguito solo dopo valutazione clinico-anamnestica dettagliata e fatta da team esperto nella diagnosi e nel trattamento delle cardiomiopatie. L'assenza di una mutazione sarcomerica non esclude una CMI familiare e inoltre la presenza di varianti genetiche di significato incerto sono difficili da interpretare¹⁸.

L'analisi genetica di campioni di tessuto o di DNA *post-mortem* può essere utile nella valutazione delle famiglie, ma deve essere attentamente interpretata alla luce di un'accurata ispezione autoptica del cuore ed in conformità con le regole convenzionali per l'assegnazione di patogenicità alle varianti genetiche¹⁹. In tutto il mondo è in genere il probando (la prima persona nella famiglia con la diagnosi di malattia), e non il medico, a dover informare i familiari sulla possibilità e utilità dello screening clinico²⁰.

Famiglie con mutazione genetica identificata

Modelli decisionali economici hanno dimostrato che la combinazione di test genetici e lo screening clinico identificano più individui a rischio di sviluppare la malattia e permettono di interrompere il follow-up in un numero maggiore di individui, risultando costo-efficace²¹.

Per questo motivo, il test genetico a cascata dovrebbe essere offerto a tutti i parenti, in particolare ai consanguinei di familiari affetti, quando una mutazione definitiva è identificata nel probando. Qualora non sia identificata alcuna mutazione nei parenti e il fenotipo sia del tutto negativo, il follow-up non è generalmente indicato; comunque si raccomanda la rivalutazione in caso di comparsa di sintomi o qualora nuovi dati clinicamente rilevanti emergessero nella famiglia (Tabella 2, Figura 1).

Tabella 2. Raccomandazioni sui test clinici e genetici da eseguire nei familiari adulti del probando.

| Raccomandazioni | Classe ^a | Livello ^b |
|--|---------------------|----------------------|
| Lo screening genetico "a cascata", previa consulenza pre-test, è raccomandato nei familiari adulti di primo grado dei pazienti con una definita mutazione responsabile della malattia. | I | B |
| Una valutazione clinica mediante ECG, ecocardiografia e follow-up a lungo termine è raccomandata nei familiari di primo grado che presentano la stessa mutazione definita responsabile della malattia del probando ^c . | I | C |
| I familiari di primo grado che non presentano la stessa mutazione definita responsabile della malattia del probando ^c devono essere dispensati da ulteriori follow-up ma devono essere invitati ad effettuare una rivalutazione qualora sviluppino nuovi sintomi o emergano nuovi dati clinicamente rilevanti nella famiglia. | Ila | B |
| Quando nessuna mutazione genetica è stata identificata o non è stato eseguito il test genetico, una valutazione clinica mediante ECG ed ecocardiografia deve essere presa in considerazione nei familiari adulti di primo grado, da ripetersi ogni 2-5 anni (o ogni 6-12 mesi se sono presenti anomalie non diagnostiche). | Ila | C |

^a classe di raccomandazione; ^b livello di evidenza; ^c probando: generalmente il primo membro della famiglia nel quale sia stata diagnosticata la malattia.

Adattata da Elliott et al.¹.

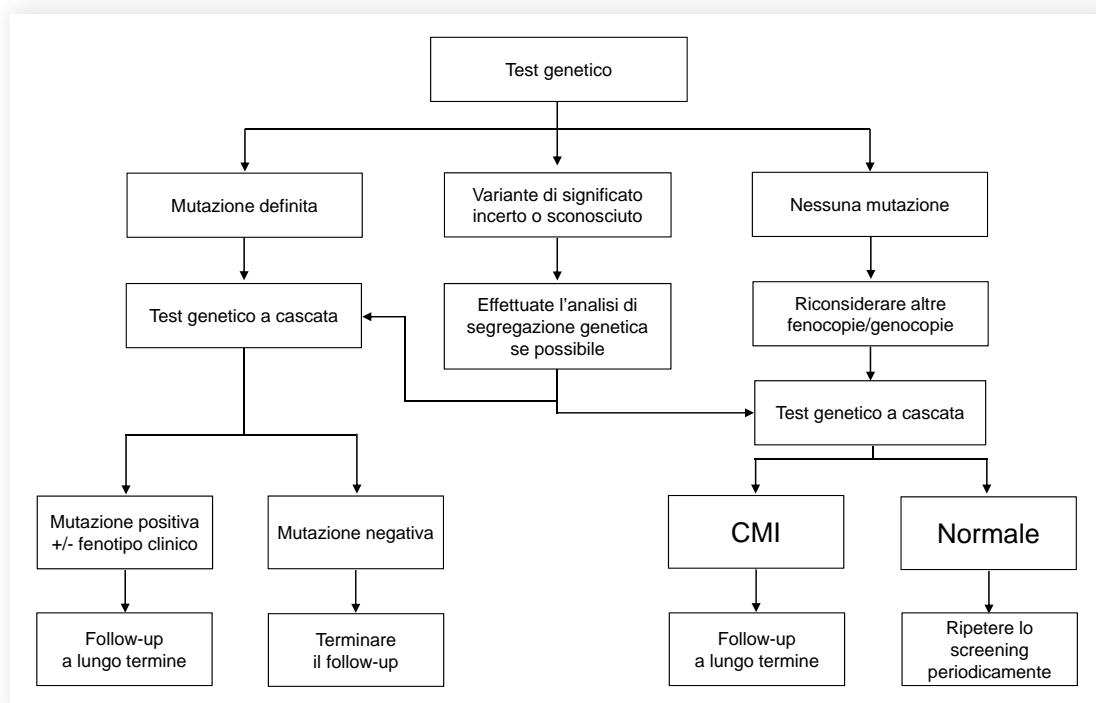


Figura 1. Flow-chart per lo screening clinico e genetico nei probandi e loro familiari. Riprodotta da Elliott et al.¹.

Famiglie senza mutazione genetica identificata

Ai parenti adulti di primo grado dovrebbe essere offerto lo screening clinico con ECG ed ecocardiografia quando i test genetici non vengono eseguiti nei probandi, o quando l'analisi genetica non riesce a individuare una mutazione definita o quando rivela una o più varianti genetiche di significato sconosciuto^{22,23} (Tabella 3). È importante ricordare il fenomeno della penetranza età-correlata: ciò significa che un normale esame clinico-strumentale non esclude la possibilità di sviluppo della malattia nel futuro; pertanto i parenti di primo grado dovrebbero ripetere la valutazione nel tempo.

La frequenza dello screening clinico in assenza di una diagnosi genetica deve essere guidata dall'età di insorgenza e dalla gravità della cardiomiopia all'interno della famiglia (es. presenza di morti improvvise) e dalla partecipazione ad attività sportive e competitive. Persone che hanno caratteristiche clinico-strumentali non ancora sufficienti per la diagnosi di malattia dovrebbero essere valutate inizialmente a intervalli di 6-12 mesi e poi meno frequentemente, se non vi è progressione del quadro²².

Lo screening clinico e genetico nei bambini

Un approccio diverso può essere considerato in età pediatrica; infatti in questo caso è necessario tener conto delle implicazioni a lungo termine di un test genetico positivo. Su richiesta dei genitori o del tutore legale, la valutazione clinica può precedere o essere sostituita alla valutazione genetica, quando questa è ritenuta essere la scelta migliore nell'interesse del minore. Vi sono potenziali benefici dello screening in età evolutiva; questi includono la riduzione di incertezza e di ansia, la possibilità di fare progetti di vita realistici e la sorveglianza clinica mirata²⁴. Dall'altro lato esiste un potenziale danno che include l'aumento dell'ansia, l'alterazione dell'immagine di sé, la di-

Tabella 3. Raccomandazioni sull'esecuzione del test genetico nei bambini.

| Raccomandazioni | Classe ^a | Livello ^b |
|--|---------------------|----------------------|
| I figli dei pazienti con mutazione genetica definita responsabile della malattia devono essere valutati per test genetici predittivi – previa consulenza familiare pre-test – quando hanno più di 10 anni di età e questi devono essere eseguiti in accordo con le linee guida internazionali per i test genetici nei bambini. | Ila | C |
| Nei bambini di età ≥10 anni che sono parenti di primo grado e nei quali l'assetto genetico non è noto, una valutazione mediante ECG ed ecocardiografia deve essere presa in considerazione ogni 1-2 anni tra i 10 ed i 20 anni di età, e ogni 2-5 anni successivamente. | Ila | C |
| Se richiesto dai genitori o dal legale rappresentante, la valutazione clinica mediante ECG ed ecocardiografia può precedere o sostituire la valutazione genetica dopo consulenza di medici esperti e quando è in accordo con l'interesse superiore del minore. | IIb | C |
| In presenza di storia familiare positiva per un esordio precoce della malattia o se i figli hanno sintomi cardiaci o sono coinvolti in attività fisiche particolarmente impegnative, un test clinico o genetico può essere preso in considerazione nei bambini che sono parenti di primo grado prima dei 10 anni di età. | IIb | C |

^a classe di raccomandazione; ^b livello di evidenza. Adattata da Elliott et al.¹.

storsione della percezione del bambino da parte dei genitori e di altri adulti responsabili (come gli insegnanti), l'assenza di progettualità futura. Pochi sono i dati in letteratura circa l'outcome nei bambini con mutazione genetica, senza fenotipo.

Il punto di vista espresso in queste linee guida è che lo screening clinico e genetico dovrebbe essere preso in considerazione a partire dall'età di 10 anni. I controlli clinici o la ricerca genetica in giovane età possono essere opportuni in famiglie con disturbi ad esordio precoce (es. disturbi delle proteinchinasi della famiglia MAPK [*mitogen-activated protein-kinase*], con conseguente difetto di fosforilazione di alcune proteine che si legano al DNA, errori del metabolismo o mutazioni multiple del sarcomero), quando vi è una storia familiare maligna nell'età infantile, quando si manifestano sintomi cardiaci o quando i bambini praticano un'attività sportiva agonistica.

Follow-up dei portatori della mutazione senza fenotipo

In questo gruppo rientrano individui con genotipo positivo e fenotipo negativo. Ci sono pochi dati sulla storia naturale di individui che sono portatori di una mutazione genetica e che non hanno il fenotipo, recenti studi suggeriscono un decorso clinico benigno per la maggior parte dei portatori di mutazione che non hanno la malattia²⁵. La morte cardiaca improvvisa è rara in assenza di ipertrofia cardiaca ed è isolata principalmente in report di pazienti con mutazioni della troponina T²⁶.

Test prenatale

La diagnosi genetica prenatale può essere eseguita all'inizio della gravidanza con un prelievo dei villi coriali o l'amniocentesi, ma la procedura non è legalmente riconosciuta in alcuni paesi europei ed è limitata a malattie gravi e incurabili in altri. Data la considerevole variabilità nell'espressione fenotipica della CMI e della storia naturale, spesso benigna, la diagnosi genetica prenatale di CMI sarà raramente appropriata. L'utilizzo dell'eco-

cardiografia fetale per individuare la malattia precoce non è raccomandato, perché la probabilità di espressione cardiaca nel feto è estremamente bassa, con l'eccezione di alcuni disturbi sindromici e metabolici.

CONCLUSIONI

Le nuove linee guida ESC sulla CMI appaiono pratiche, innovative e, per le attuali conoscenze, sufficientemente basate sull'evidenza. Il ruolo del test genetico nelle forme familiari a fini di screening è di particolare utilità nei soggetti che non presentano il fenotipo e che, grazie a questa informazione, potranno essere seguiti con follow-up appropriato o, in caso di negatività, rassicurati. L'utilità è provata anche nei quadri sindromici o dubbi. Persiste qualche elemento di contraddittorietà fra i limiti noti delle metodiche di caratterizzazione genetica, la bioinformatività delle famiglie e la raccomandazione di caratterizzare geneticamente *sempre* anche i casi sporadici lasciando ad uno step successivo la valutazione clinica e strumentale.

Il documento sottolinea come nella gestione di questa patologia sia fondamentale l'accuratezza della diagnosi clinica, senza la quale le informazioni delle indagini sarebbero fuorvianti nel guidare i test genetici. Spetta al clinico riconoscere eventuali "red flags" e fenotipi peculiari per guidare l'analisi genetica. Lo screening genetico ha delle ricadute importanti sui familiari e sui minori, pertanto la gestione dei test genetici deve essere eseguita in laboratori certificati e i risultati comunicati da team esperti.

BIBLIOGRAFIA

1. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, et al. 2014 ESC guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014;35:2733-79.
2. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio AL, et al. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2013;34:1448-58.
3. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008;29:270-6.
4. Ng CT, Ong HY, Cheok C, Chua TS, Ching CK. Prevalence of electrocardiographic abnormalities in an unselected young male multi-ethnic South-East Asian population undergoing pre-participation cardiovascular screening: results of the Singapore Armed Forces Electrocardiogram and Echocardiogram screening protocol. *Europace* 2012;14:1018-24.
5. Lopes LR, Zekavati A, Syrris P, et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2013;50:228-39.
6. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008;83:630-8.
7. Olivetto I, Girolami F, Sciagrà R, et al. Microvascular function is selectively impaired in patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomere myofilament gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:839-48.
8. Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, Mogensen J, McKenna WJ, Elliott P. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:10-7.
9. Lopes LR, Rahman MS, Elliott PM. A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart* 2013;99:1800-11.
10. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet* 2005;42:e59.
11. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1444-53.
12. Richard P, Charron P, Carrier L, et al.; EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-32.
13. Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;108:445-51.
14. Godard B, Kaariainen H, Kristofferson U, Tranebjaerg L, Coviello D, Ayme S. Provision of genetic services in Europe: current practices and issues. *Eur J Hum Genet* 2003;11(Suppl 2):S13-48.
15. Godard B, ten Kate L, Evers-Kiebooms G, Ayme S. Population genetic screening programmes: principles, techniques, practices, and policies. *Eur J Hum Genet* 2003;11(Suppl 2):S49-87.
16. Godard B, Raeburn S, Pembrey M, Bobrow M, Farndon P, Ayme S. Genetic information and testing in insurance and employment: technical, social and ethical issues. *Eur J Hum Genet* 2003;11(Suppl 2):S123-42.

- 17.** Andersen PS, Havndrup O, Hougs L, et al. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Hum Mutat* 2009;30:363-70.
- 18.** Charron P, Arad M, Arbustini E, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2010;31:2715-26.
- 19.** Bagnall RD, Das KJ, Duflou J, Semsarian C. Exome analysis-based molecular autopsy in cases of sudden unexplained death in the young. *Heart Rhythm* 2014;11:655-62.
- 20.** van der Roest WP, Pennings JM, Bakker M, van den Berg MP, van Tintelen JP. Family letters are an effective way to inform relatives about inherited cardiac disease. *Am J Med Genet A* 2009;149A:357-63.
- 21.** Ingles J, McGaughran J, Scuffham PA, Atherton J, Semsarian C. A cost-effectiveness model of genetic testing for the evaluation of families with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2012;98:625-30.
- 22.** Hershberger RE, Cowan J, Morales A, Siegfried JD. Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009;2:253-61.
- 23.** Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA Expert Consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm* 2011;8:1308-39.
- 24.** Jensen MK, Havndrup O, Christiansen M, et al. Penetrance of hypertrophic cardiomyopathy in children and adolescents: a 12-year follow-up study of clinical screening and predictive genetic testing. *Circulation* 2013;127:48-54.
- 25.** Ross LF, Saal HM, David KL, Anderson RR. Technical report: Ethical and policy issues in genetic testing and screening of children. *Genet Med* 2013;15:234-45.
- 26.** Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;23:685-713.