



ORIGINAL

Diagnóstico genético de fibrosis quística mediante la técnica de desnaturalización de ADN a alta resolución (HRM)



Tegra Barreiro Martínez*, María Ángeles López, Clara Gómez, Elena Durán Verdasco y Paloma Martínez Montero

Unidad de Genética Molecular, INGEMM, IdIPAZ, CIBERER, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

Recibido el 2 de junio de 2015; aceptado el 21 de julio de 2015

Disponible en Internet el 14 de septiembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Fibrosis quística;
HRM;
Mutaciones;
CFTR

Resumen La fibrosis quística es la enfermedad grave de herencia autosómica recesiva más frecuente en la raza caucásica, con una incidencia estimada entre 1/2.000 y 1/6.000 nacidos vivos y causada por mutaciones en el gen *CFTR*. La casi totalidad de los pacientes desarrollan una enfermedad pulmonar crónica y progresiva, que es la causa más frecuente de la morbi-mortalidad. En el 85% de los casos existe disfunción pancreática (exocrina o endocrina). El diagnóstico de la fibrosis quística se basa esencialmente en la historia clínica, aunque el diagnóstico etiológico es el diagnóstico molecular, con la identificación de las mutaciones en el gen *CFTR*. Para ello, existen técnicas de rastreo de mutaciones que identifican patrones anormales en la secuencia que necesitan ser confirmadas por secuenciación del ADN. Actualmente se acepta que el HRM es la técnica de rastreo más sensible en la búsqueda de variantes en la secuencia de ADN. Alternativamente, existen baterías diagnósticas actualmente disponibles comercialmente, que identifican las mutaciones más frecuentes en fibrosis quística con una sensibilidad superior al 75%.

En este trabajo hemos hecho un análisis del gen *CFTR* en pacientes con fibrosis quística mediante la técnica de rastreo de mutaciones basada en la desnaturalización a alta resolución del ADN (*High Resolution Melting* [HRM]). En paralelo, en los mismos pacientes, hemos hecho un estudio comparativo de la sensibilidad del HRM con dos test comerciales y de estos dos test entre sí. Uno de los test, Devyser, incluye una batería complementaria para la identificación de mutaciones específicas de la población española. Los resultados de este trabajo indican que el HRM tiene una sensibilidad cercana al 100% en la detección de mutaciones y polimorfismos en el gen *CFTR*. Además la técnica de HRM es también más sensible que los test comerciales en el diagnóstico molecular de pacientes de fibrosis quística.

© 2015 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: t.barreiro@yahoo.es (T. Barreiro Martínez).

KEYWORDS

Cystic fibrosis;
HRM;
Mutations;
CFTR

Genetic diagnosis of cystic fibrosis by high resolution melting of DNA (HRM)

Abstract Cystic fibrosis is the severe disease of autosomal recessive inheritance most common in caucasians, with an estimated incidence between 1/2,000 and 1/6,000 live births. This disease is caused by mutations in the *CFTR* gene. Almost all patients develop a chronic, progressive lung disease, which is the most common cause of morbidity and mortality. In 85% of cases there is also pancreatic dysfunction (exocrine and endocrine). The diagnosis of cystic fibrosis is essentially based on clinical history, although the etiologic diagnosis is the diagnosis at molecular level, with the identification of mutations in the *CFTR* gene. For this purpose, there are screening techniques that identify abnormal patterns that need to be confirmed by DNA sequencing. It is now accepted that the HRM is the most sensitive screening technique in the search for variants in the DNA sequence. Alternatively, there are diagnostic batteries currently available commercially, which identify the most common cystic fibrosis mutations with sensitivity greater than 75%.

In this work we have done an analysis of the *CFTR* gene in cystic fibrosis patients by the screening technique based on denatured DNA at high resolution (High Resolution Melting [HRM]). In parallel, in the same patients, we have made a comparative study of the sensitivity of the HRM with two commercial test. One of the test, Devyser includes an additional battery for identification of specific mutations in the Spanish population. Results obtained indicated that HRM has a sensibility closed to 100% for the detection of mutations and polymorphisms in *CFTR* gene. Furthermore, HRM presented higher sensitivity than the commercial tests for molecular diagnosis of cystic fibrosis patients.

© 2015 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad grave de herencia autosómica recesiva más frecuente en la raza caucásica, con una incidencia estimada entre 1/2.000 y 1/6.000 nacidos vivos y causada por mutaciones en el gen *CFTR*. Se han descrito hasta la fecha cerca de 2.000 variantes en el gen *CFTR* (recogidas en la base de datos *Cystic Fibrosis Database*)¹, de las que tan solo 9 tienen una frecuencia mayor del 2% entre los pacientes de fibrosis quística a nivel mundial.

La casi totalidad de los pacientes desarrolla una enfermedad pulmonar crónica y progresiva, que es la causa más frecuente de la morbilidad. En el 85% de los casos existe disfunción pancreática (exocrina o endocrina). Aunque también son frecuentes las alteraciones hepatobiliares y genitourinarias, con azoospermia obstructiva en los varones, la insuficiencia pancreática y la enfermedad pulmonar son las que determinan la gravedad del proceso así como su pronóstico². La supervivencia ha mejorado de forma importante durante los últimos cuarenta años pasando de no superar los 4 años de vida a alcanzar los 40 años o más³. Los avances realizados en el diagnóstico, el seguimiento de pacientes en unidades especializadas y la mejora en las terapias han provocado esta importante disminución en la morbilidad⁴.

El diagnóstico de la FQ se basa esencialmente en la historia clínica, que incluye síntomas como el íleo meconial (obstrucción intestinal) en las primeras 24 horas⁵, presente en alrededor del 15% de los niños con FQ, y el retraso ponderal. Una proporción significativa de los niños desarrollan síntomas respiratorios cada vez más graves. Estos síntomas, junto con los resultados anormales de una prueba de la

tripsina inmunorreactiva en el cribado neonatal⁶ y/o la elevación de las concentraciones de iones de cloro y sodio en el sudor (prueba del sudor)⁷, orientan hacia el diagnóstico de FQ.

Sin embargo, el diagnóstico etiológico es el diagnóstico molecular, con la identificación de las mutaciones en el gen *CFTR*.

Para ello, existen técnicas de rastreo de mutaciones como el *Single Strand Conformational Polymorphisms*, el *denaturing High Performance Liquid Chromatography* o más recientemente el *High Resolution Melting* (HRM)^{8,9}, que detecta patrones anormales en la secuencia que necesitan ser identificadas por secuenciación del ADN. Actualmente se acepta que el HRM es la técnica de rastreo más sensible en la búsqueda de variantes en la secuencia de ADN. El análisis por HRM es un método de análisis pos-PCR utilizado para identificar variaciones en la secuencia de ácidos nucleicos. Se basa en la detección de pequeñas diferencias en las curvas de *melting* (desnaturalización o disociación) de la doble cadena de ADN. La técnica detecta pequeñas variaciones en la fluorescencia gracias al uso de un reactivo fluorescente intercalante, diseñado específicamente para que una gran cantidad de moléculas se una específicamente a la doble cadena de ADN. Otra de las virtudes de la técnica es la instrumentación, que permite seguir en tiempo real el *melting* del ADN, gracias a que posee un preciso control de rampa de temperatura y un sistema de captura de datos avanzado. Los datos se analizan utilizando un software diseñado específicamente para el análisis por HRM. Es decir que, tras la PCR, los productos de reacción obtenidos son desnaturalizados gradualmente, y la disminución de la fluorescencia a medida que el ADN se convierte en ADN de cadena sencilla

es medida en tiempo real. La forma de la curva de *melting* de alta resolución varía según las diferencias en la secuencia de ADN, de forma que es posible distinguir entre secuencias que difieren en tan solo un par de bases. Esta técnica no es destructiva, por lo que los productos de reacción identificados pueden ser utilizados directamente para la posterior secuenciación mediante la técnica de Sanger.

La secuenciación por el método Sanger era, hasta ahora, la técnica indicada para la identificación de alrededor del 98% de las mutaciones en *CFTR*. No detecta, sin embargo, las grandes delecciones o inserciones ni las mutaciones intrónicas profundas, alejadas de los exones. Las técnicas de secuenciación de ADN de nueva generación (NGS) pueden alcanzar una sensibilidad cercana al 100% si bien en la actualidad los protocolos todavía no están del todo optimizados.

Tanto la secuenciación Sanger como la NGS son técnicas laboriosas y costosas que, en el caso del diagnóstico molecular de FQ, deberían de reservarse para aquellos pacientes en los que no se han podido llegar a detectar las mutaciones mediante técnicas de rastreo o por la utilización de baterías diagnósticas actualmente disponibles en el mercado, que identifican las mutaciones más frecuentes en *CFTR* con una sensibilidad superior al 75%. Estos test comerciales habitualmente se diseñan para la identificación de las mutaciones más frecuentes en la población noreuropea y norteamericana, ignorando la existencia de otras mutaciones frecuentes en poblaciones del sur de Europa. En este trabajo hemos hecho un análisis del gen *CFTR* en pacientes FQ mediante la técnica de rastreo de mutaciones basada en la desnaturalización a alta resolución del ADN (HRM). En paralelo, en los mismos pacientes, hemos hecho un estudio comparativo de la sensibilidad del HRM con dos test comerciales y de estos dos test entre sí. Uno de los test, Devyser, incluye una batería complementaria para la identificación de mutaciones específicas de la población española.

Material y métodos

Muestras de ADN

Se ha analizado una serie de 186 ADN procedentes de 139 familias y 47 individuos no relacionados. Del total de ADN analizados 73 pertenecían a pacientes FQ y 22 a pacientes con patologías asociadas a mutaciones en el gen *CFTR* como azoospermia, pancreatitis o bronquiectasias (*CFTR*-RD)¹⁰, diagnosticados clínicamente en las Unidades de Fibrosis Quística y en los Servicios de Urología de hospitales españoles. De los ADN restantes, 66 pertenecían a familiares de pacientes FQ con mutaciones en *CFTR* y el resto, 25 ADN, fueron controles. Los criterios diagnósticos para FQ fueron los recogidos por el Consenso Europeo de la *Cystic Fibrosis Foundation* para el diagnóstico de FQ¹¹. Las recomendaciones actuales incluyen la presencia de sospecha clínica con uno o más rasgos fenotípicos característicos, o antecedentes familiares, o un resultado positivo del cribado neonatal (basado en la determinación de TIR), junto con pruebas bioquímicas o genéticas que indiquen anomalía de la *CFTR* (documentadas por un test de sudor positivo, mutaciones en ambos alelos del gen *CFTR*, o alteraciones características en el transporte iónico a través del epitelio nasal).

El ADN genómico se aisló a partir de leucocitos de sangre periférica mediante procedimientos estandarizados (kit comercial *Qiagen Gentra Puregene Blood*®).

Todas las muestras del estudio han sido analizadas por HRM, Sanger, Innolipa y Devyser.

Amplificación del ADN

La reacción de PCR, previa al análisis de HRM, se llevó a cabo con el reactivo LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) que contiene el buffer, la ADN polimerasa y el reactivo fluorescente intercalante, que en este caso es el LCGreen Plus. Además, la mezcla contenía 0,1 mM de cada cebador y 10 ng de ADN en 10 µL de volumen final de reacción. Para producir material suficiente para el análisis se realizaron 45 ciclos de reacción. Las condiciones de la PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 16 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 63 °C (con una rampa de descenso de temperatura de 2,2 °C/segundo, -0,5 °C/ciclo) y 1 minuto a 72 °C, y 29 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 1 minuto a 72 °C. A continuación 10 minutos de elongación a 72 °C. Finalmente, el producto amplificado se calentó a 95 °C durante 30 segundos y se enfrió hasta 25 °C con una rampa de descenso de 5 °C cada minuto para favorecer la formación de heterodúplex.

Diseño de cebadores y sonda para detección del polimorfismo de repeticiones 5 T/7 T/9 T en el intrón 9 del gen *CFTR*

Se diseñaron cebadores intrónicos para amplificar los 27 exones y regiones flanqueantes del gen *CFTR*. Para ello se utilizaron los programas Primer3¹², Oligo analyser 3.1¹³, y SNPcheck¹⁴.

Cada exón y regiones intrónicas adyacentes fue analizado en un único amplicón, excepto el exón 14, que fue necesaria su división en 3 amplicones, para no sobrepasar la longitud de amplicón adecuada para el análisis por HRM. Las secuencias de los cebadores se muestran en la [tabla 1](#).

Para el ensayo de la detección del polimorfismo 5T/7T/9T en el intrón 9 del gen *CFTR* se diseñó una sonda con un 100% de complementariedad con la variante 5T y dos cebadores para la amplificación de esa región del intrón 9. La secuencia de la sonda, que en este tipo de ensayos recibe el nombre de SondaLunaTM, fue: 5'-CCAAATCCCTGTTAAAAACACACACACACA-3'-P. Las secuencias de los cebadores fueron: 5'-GGCCATGTGCTTTTCAAAC-3' para el cebador F y 5'-AAGAAGAGGCTGTCATCACCA-3' para el cebador B. Para conseguir una señal óptima el ensayo requiere además de una PCR asimétrica, en la que los cebadores F y B están presentes en concentraciones diferentes, normalmente en una proporción 1:5. Con la PCR asimétrica se consigue producir en exceso la hebra reconocida por la sonda permitiendo que esta hibride con su secuencia diana, la variante. El programa PCR fue el mismo que el utilizado para la amplificación de los 27 exones de *CFTR* y al producto de PCR se le añadieron 0,25 µL de una disolución de 4 mM de la sonda.

Tabla 1 Secuencias de los cebadores utilizados para el análisis de cada uno de los exones (y secuencias intrónicas adyacentes) del gen CFTR mediante HRM

Exón	Cebador	Secuencia	Tm	GC (%)	Longitud Amplicón (bp)
1	FQ-1iF	GAAGCAAATGACATCACAGC	56,857,8	56,1	277
	FQ-1iR	AAACTGCTTATTCCTTTACCCC			
2	FQ-2F	CCAAATCTGTATGGAGACCAAA	58,959,9	34,1	310
	FQ-2R	TGGGATTACAGGCATTAGCC			
3	FQ-3iF	CTTGGGTTAATCTCCTTGGA	56,751,7	34,1	309
	FQ-3iR	ATTCACCAGATTTCTGTAGTC			
4	FQ-4F	CTTGTGTTGAAATCTCAGGG	57,350,9	41,2	378
	FQ-4R	TTGTACCAGCTCACTACCTA			
5	FQ-5F	ATTTCTGCCTAGATGCTGGG	59,361,1	25,9	395
	FQ-5R	AACTCCGCCTTTCCAGTTGT			
6	FQ-6F	GGGGTGGAGATACAATGACA	59,758,1	44,7	286
	FQ-6R	CTGGTTTTACTAAAGTGGGCTTT			
7	FQ-7F	GATTACAGAGATCAGAGAG	45,955,0	32,6	221
	FQ-7R	GAGGTGGAAGTCTACCATGA			
8	FQ-8F	GAGACCATGCTCAGATCTTCC	54,951,3	37,6	421
	FQ-8R	GCACATTTTTGCAAAGTTCATT			
9	FQ-9F	GCTTGGCAAATTAACCTTTAGAACA	59,055,2	25,1	308
	FQ-9R	AGTTAGGTGTTTAGAGCAAACAA			
10	FQ-10F	GGGAATTATTTGAGAAAGCAAAACA	61,756,4	36,5	263
	FQ-10R	AAAATACCTTCXAGCACTACAACTAGAA			
11	FQ-11F	GAATATACACTTCTGCTTAGG	60,059,0	37,3	297
	FQ-11R	AACCGATTGAATATGGAGCC			
12	FQ-12F	ACATTAGAAGGAAGATGTGCC	55,958,1	34,1	307
	FQ-12R	ACTAGCCATAAAACCCAGG			
13	FQ-13F	GCATGTAGTGAAGTGTAAAGGC	58,058,7	29,1	230
	FQ-13R	TCTTCTTTTATTTTAGCATGAGCA			
14	FQ-14aF	TGCAATAAAACATTAACAAAATGC	58,360,5	28,0	268
	FQ-14aR	CACATCCCATGAGTTTTGAGC			
	FQ-14bF	CAGAACTCCAAAATCTACAGCC	58,660,3	37,3	331
	FQ-14bR	TCTGGTACTAAGGACAGCCTTCTC			
	FQ-14cF	GATTCTGAGCAGGGAGAGG	57,359,3	48,2	297
	FQ-14cR	AAATACCCCCAAGCGATGTA			
15	FQ-15F	CACAATGGTGGCATGAAACTG	62,353,6	33,7	230
	FQ-15R	ACTTTAAATCCAGTAATACTTTACAATAGAACA			
16	FQ-16F	ACCCAGGAACACAAAGCAAA	55,255,3	38,8	314
	FQ-16R	CCACTACCATAATGCTTGGGAG			
17	FQ-17F	GACTCAAGTTTAGTTCCATTACATG	57,564,3	39,2	404
	FQ-17R	ACCAACAAAACACAGGCC			
18	FQ-18F	TGGGTTCTGAATGCGTCTAC	58,760,1	29,4	295
	FQ-18R	CAGGACTTCAACCCTCAATCA			
19	FQ-19F	TCACTGACACACTTTGTCCAC	57,155,8	38,6	254
	FQ-19R	CAAGATGAGTATCGCACATTC			
20	FQ-20F	ATGGCACCAGTGTGAAAA	55,853,9	29,8	442
	FQ-20R	ATGCAGCATTTTATTCATTG			
21	FQ-21F	TGTGCCCTAGGAGAAGTGTG	36,5	36,5	335
	FQ-21R	TGACAGATACACAGTGACCCTCA			
22	FQ-22F	CAAACAAATTGTGAAATTGTCTGC	57,959,5	38,4	388
	FQ-22R	GCTAACACATTGCTTCAGGCT			
23	FQ-23F	GTACAATACTGAATTATGTTTATGGC	55,554,4	42,0	323
	FQ-23R	GCAGAGTAATATGAATTTCTTGAG			
24	FQ-24F	AAGTTATTCATACTTTCTTCTCTTTT	49,743,0	32,3	195
	FQ-24R	TATATCAGCCATTTGTG			
25	FQ-25F	GGGGTAGAGGGATTGGTATG	58,262,7	44,3	364
	FQ-25R	TGTCACCATGAAGCAGGCAT			
26	FQ-26F	ATAGAACAATAGACATATTATCAAGG	52,456,5	31,8	328
	FQ-26R	TAAAGCTGGATGGCTGTATG			
27	FQ-27F	CCAGTTTCTGTCCCTGCTC	58,463,8	53,3	326
	FQ-27R	TCCACGAGCTCCAATTCCATGAGCAAATG			

GC : porcentaje de guaninas más citosinas en la secuencia del oligonucleótido cebador; Tm : temperatura de fusión.

Análisis por HRM

El HRM de los productos de PCR se llevó a cabo con el equipo LightScanner® 96HR (Idaho Technology, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos). Dispone de una rampa de temperatura precisa que permite realizar la desnaturalización de los productos de PCR aumentando gradualmente la temperatura hasta 95 °C mediante un programa capaz de incrementar la temperatura 0,1 °C/segundo con exposiciones de 14 a 30 milisegundos. Los datos fueron analizados con el software LightScanner de Idaho Technology (Salt Lake City, Utah, Estados Unidos). Tras el análisis de desnaturalización se estableció la relación para cada exón del perfil de HRM con cada una de las variantes encontradas en la secuenciación del ADN.

Detección de mutaciones en el gen *CFTR* mediante test comerciales

Uno de los test diagnósticos comparados con el análisis de HRM fue el test de Devyser *CFTR*, compuesto por dos paneles de mutaciones, el Core y el Iberia, con variantes frecuentes en población española (Devyser AB, Hägersten, Suecia). Se basa en la amplificación específica de alelos normales y alelos mutados en el gen *CFTR*. La amplificación específica de alelo genera fragmentos de PCR marcados con fluorescencia que se analizan por electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3730xL. Arrays 36 cm. POP 7 (Applied Biosystems™, California, Estados Unidos).

El otro test incluido en este análisis fue el de INNO-LiPA *CFTR* (Fujirebio Europe Headquarters, Technologiepark 6, Gent, Bélgica) que es un ensayo basado en el principio de hibridación inversa, para la detección e identificación simultánea de mutaciones de fibrosis quística y de las secuencias normales.

Los test Devyser Core e Iberia analizan 54 mutaciones con frecuencias en la población de pacientes FQ que van desde más del 50% para la más frecuente (la mutación p.Phe508del) hasta menos del 0,1% para la menos frecuente de las incluidas. El test INNO-LiPA incluye 36 mutaciones encontradas en pacientes de FQ en la población noreuropea y norteamericana con frecuencias que van también desde más del 50% para la más frecuente hasta menos del 0,1% para las menos frecuentes de las incluidas. Ambos kits detectan el polimorfismo 5 T, 7 T, 9 T del extremo 3' del intrón 9.

Secuenciación del gen *CFTR*

Se llevó a cabo la secuenciación del gen *CFTR* de todos los ADN que han sido incluidos en el análisis de HRM. Para ello se utilizaron los mismos amplicones de HRM para la secuenciación de los 27 exones y regiones flanqueantes del gen. Los productos de ADN amplificado se secuenciaron por el método Sanger con terminadores fluorescentes (kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Applied Biosystems™, California, Estados Unidos) y se analizaron en el secuenciador ABI 3730xL. Se secuenciaron ambas hebras de ADN. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia normal almacenada en Genbank con la referencia NG_016465.3.

Resultados

Sensibilidad del HRM en la detección de mutaciones causantes de FQ y de polimorfismos de ADN en el gen *CFTR*

El objetivo de este trabajo es establecer la sensibilidad de la técnica de HRM para detectar mutaciones y polimorfismos en el gen *CFTR* y con ello contribuir al diagnóstico de pacientes FQ. En todos los ADN se realizó la secuenciación Sanger de todos los exones de *CFTR* y regiones flanqueantes. Como se muestra en las tablas 2 y 3, en un total de 186 ADN analizados se detectaron 85 variantes de ADN distintas, entre estas 45 variantes *missense*, 8 *nonsense*, 20 de *splicing*, 3 inserciones de una base y 3 deleciones de una base que generaron codones de terminación, 4 pequeñas deleciones, y una delección *in-frame* de 84 pares de bases. Del total de variantes detectadas 64 son mutaciones causantes de FQ y 21 son polimorfismos neutros sin efecto sobre la función de *CFTR* y frecuentes en la población normal.

La técnica permitió identificar perfiles de HRM diferentes y reproducibles para muestras con distintas mutaciones, así como perfiles de HRM iguales y reproducibles para muestras diferentes con la misma mutación. En la figura 1 se muestran los perfiles de HRM para diferentes variantes identificadas en el exón 12. Los tres ADN con la mutación p.Gly542* muestran perfiles de HRM idénticos entre sí, diferentes a los de otros ADN con las mutaciones p.Arg553* y p.Gly551Arg, y claramente distinguibles de los controles negativos incluidos en el análisis.

La sensibilidad de la técnica en las condiciones de análisis empleadas y para la detección de todas las variantes estudiadas fue del 100% (85/85). El HRM es una técnica diseñada fundamentalmente para la detección de mutaciones en heterocigosis, pero no así para las mutaciones en homocigosis, ya que los cambios en homocigosis no forman heterodúplex y no siempre proporcionan un perfil de HRM distinto al de los controles. Además de las variantes en heterocigosis, en este estudio se han analizado muestras de ADN con las mutaciones p.Phe508del, p.Gly542* y p.Arg553* y los polimorfismos p.Thr854Thr y c.869 + 11C > T en homocigosis y todas ellas dieron resultados positivos. La figura 2 muestra los resultados obtenidos para las mutaciones p.Gly542* y p.Arg553* en homocigosis y heterocigosis.

Como un ejemplo de análisis complejo de HRM, en la figura 3 se muestra el perfil de HRM de variantes detectadas en el exón 11. En este exón de *CFTR*, además de la mutación más frecuente en FQ, p.Phe508del, suele presentarse con una frecuencia cercana al 50% en heterocigosis el polimorfismo p.Met470Val (c.1408A > G; distribución en la población A = 0,5821, G = 0,4179). Este hecho determina que sean seis los perfiles posibles de HRM cuando solamente estas dos variantes están presentes en el ADN analizado, cada una de ellas en homocigosis y en heterocigosis combinándola con la otra en homocigosis o heterocigosis. Si consideramos que además pueden aparecer otras mutaciones en este exón/intrón como p.Ile507del (detectada 5 veces en esta serie, tabla 4) y c.1393-2A > G (detectada 2 veces en esta serie) el patrón final se hace todavía más complejo.

Se realizó un ensayo para el genotipado del polimorfismo de repeticiones 9 T, 7 T y 5 T del intrón 9. El interés de

Tabla 2 Sensibilidad del HRM en la detección de mutaciones causantes de FQ

Cambio en el ADNc	Cambio en la proteína	Reference SNP	Exón/intrón	Detectada por HRM
c.53 + 5G > C	sd	-	i1	Sí
c.224G > A	p.Arg75Gln	rs1800076	3	Sí
c.254G > A	p.Gly85Glu	rs75961395	3	Sí
c.443T > A	p.Ile148Asn	rs35516286	4	Sí
c.489 + 1G > T	sd	rs78756941	i4	Sí
c.579 + 1G > T	sd	rs77188391	i5	Sí
c.580-1G > T	sa	rs121908793	6	Sí
c.595C > T	p.His199Tyr	rs121908802	6	Sí
c.617T > A	p.Leu206Trp	rs121908752	6	Sí
c.695T > A	p.Val232Asp	rs397508783	6	Sí
c.757G > A	p.Gly253Arg	-	7	Sí
c.837A > T	p.Glu279Asp	-	7	Sí
c.948delT	p.Phe316Leufs*12	-	8	Sí
c.1000C > T	p.Arg334Trp	rs121909011	8	Sí
c.1046C > T	p.Ala349Val	rs121909021	8	Sí
c.1083delG	p.Trp361Cysfs*8	-	8	Sí
c.1094T > C	p.Leu365Pro	rs76727851	8	Sí
c.1327G > T	p.Asp443Tyr	rs147422190	10	Sí
c.1352G > T	p.Gly451Val	-	10	Sí
c.1393-2A > G	sa	rs397508201	i10	Sí
c.1450C > T	p.His484Tyr	rs397508210	11	Sí
c.1519_1521delATC	p.Ile507del	rs121908745	11	Sí
c.1521_1523delCTT(hom)	p.Phe508del	rs113993960	11	Sí
c.1624G > T (hom)	p.Gly542*	rs113993959	12	Sí
c.1652G > A (hom)	p.Gly551Asp	rs75527207	12	Sí
c.1657C > T (hom)	p.Arg553*	rs74597325	12	Sí
c.1680-1G > A	sa	rs121908794	i12	Sí
c.1682C > A	p.Ala561Glu	rs121909047	13	Sí
c.1727G > C	p.Gly576Ala	rs1800098	13	Sí
c.1817_1900del84	p.Met607_Gln634del	rs121908777	14	Sí
c.2002C > T	p.Arg668Cys	rs1800100	14	Sí
c.2017G > T	p.Gly673*	rs397508331	14	Sí
c.2021A > G	p.Asp674Gly	-	14	Sí
c.2051_2052delAA	p.Lys684Thrfs*4	-	14	Sí
c.2051_2052delAAinsG	p.Lys684Serfs*38	-	14	Sí
2176insC	p.Gln685Thrfs*4	-	14	Sí
c.2260G > A	p.Val754Met	rs150157202	14	Sí
2603delT	p.Asn825Thrfs*5	-	14	Sí
c.2566G > T	p.Asp836Tyr	rs201386642	15	Sí
c.2587C > G	p.Leu863Val	-	15	Sí
c.2657 + 5G > A	sd	rs80224560	i16	Sí
c.2668C > T	p.Gln890*	rs79633941	17	Sí
c.2738A > G	p.Tyr913Cys	rs121909008	17	Sí
c.2737_2738insG	p.Tyr913*	rs121908788	17	Sí
c.2756_2757insA	p.Tyr919*	-	17	Sí
c.2856G > C	p.Met952Ile	rs151048781	17	Sí
c.2988 + 1G > A	sd	rs75096551	i18	Sí
c.2991G > C	p.Leu997Phe	rs1800111	19	Sí
c.3041A > G	p.Tyr1014Cys	rs149279509	19	Sí
c.3134C > A	p.Ser1045tyr	-	19	Sí
c.3140-26A > G	sa	rs76151804	i19	Sí
c.3154T > G	p.Phe1052Val	rs150212784	20	Sí
c.3196C > T	p.Arg1066Cys	rs78194216	20	Sí
c.3276C > A	p.Tyr1092*	rs121908761	20	Sí
c.3299A > C	p.Gln1100Pro	rs397508535	20	Sí
c.3373G > T	p.Gly1125*	-	21	Sí
c.3454G > C	p.Asp1152Hys	rs75541969	21	Sí
c.3717 + 1G > A	sd	rs750558115	i22	Sí

Tabla 2 (continuación)

Cambio en el ADNc	Cambio en la proteína	Reference SNP	Exón/intrón	Detectada por HRM
c.3484C > T	p.Arg1162*	rs74767530	22	Sí
c.3485G > T	p.Arg1162Leu	rs1800120	22	Sí
c.3705T > G	p.Ser1235Arg	rs34911792	22	Sí
c.3846G > A	p.Trp1282*	rs77010898	23	Sí
c.3872A > G	p.Gln1291Arg	rs397508621	23	Sí
c.3909C > G	p.Asn1303Lys	rs80034486	24	Sí
c.4097T > C	p.Ile1366Thr	rs200955612	25	Sí

Sesenta y cinco mutaciones diferentes en el gen *CFTR* fueron previamente identificadas por secuenciación en 186 ADN procedentes de pacientes de FQ, CFTR-RD y familiares. Todas las mutaciones identificadas por secuenciación fueron detectadas por HRM. En la primera y segunda columna se enumeran las mutaciones por el nombre actual del cambio en el ADN codificante (ADNc) y en la proteína, respectivamente, según la nomenclatura establecida por la Human Mutation Variation Society (<http://www.hgvs.org>). En la tercera columna se indica, cuando la mutación tiene uno asociado, el número de referencia de SNP. Todas las mutaciones han sido detectadas en heterocigosis.

hom: mutaciones que han sido detectadas en homocigosis.

este análisis radica en que el alelo de repeticiones 5 T se asocia a azoospermia por ausencia bilateral de conductos deferentes. Para el análisis de este polimorfismo fue necesario diseñar y sintetizar un oligonucleótido de 30 nt con 100% de complementariedad con respecto a la variante de 5 T que se utilizó como sonda. En la [figura 4](#) se muestran los resultados obtenidos. El análisis de HRM proporcionó

un perfil diferente para cada uno de los homodúplex con 9 T, 7 T y 5 T, así como para el de los distintos heterodúplex (9 T/7 T, 9 T/5 T y 7 T/5 T). El homodúplex formado por la sonda con los alelos 5 T tiene una T_m característica y mayor que la de los heterodúplex formados con las secuencias 7 T y 9 T. Así, los homodúplex 5 T/5 T muestran un pico de disociación a 67,5 °C, mientras que los 7 T/7 T y 9 T/9 T

Tabla 3 Sensibilidad del HRM en la detección de polimorfismos de ADN en el gen *CFTR*

Cambio en el ADNc	Cambio en la proteína	Reference SNP	Exón/intrón	Detectada por HRM
c.-8G > C	sa	rs1800501	prom	Sí
c.579 + 38T > C	sd	-	i5	Sí
c.580-92T > A	sa	rs117548166	i5	Sí
c.743 + 40A > G	sd	rs1800502	i6	Sí
c.744-33_744-30delGATT	sa	-	i6	Sí
c.869 + 11C > T (hom)	sd	rs1800503	i7	Sí
c.1210-12T[5_9]	-	-	i9	Sí
c.1393-61A > G	sa	-	i10	Sí
c.1408A > G	p.Met470Val	rs213950	11	Sí
c.1584G > A	p.Glu528Glu	rs1800095	11	Sí
c.1584 + 1G > A	sd	-	i11	Sí
c.2562T > G (hom)	p.Thr854Thr	rs1042077	15	Sí
c.2604A > G	p.Val868Val	rs1800105	15	Sí
c.2898G > A	p.Thr966Thr	rs1800109	17	Sí
c.2909-71G > C	sa	-	i18	Sí
c.3080T > C	p.Ile1027Thr	rs1800112	17	Sí
c.3140-92T > C	sa	-	i19	Sí
c.3870A > G	p.Pro1290Pro	rs1800130	23	Sí
c.4243-5C > T	sa	rs114402068	i26	Sí
c.4272C > T	p.Tyr1424Tyr	rs1800135	27	Sí
c.4389G > A	p.Gln1463Gln	rs1800136	27	Sí

Veintiún polimorfismos diferentes en el gen *CFTR* fueron previamente identificados por secuenciación en 186 ADN procedentes de pacientes de FQ, CFTR-RD y familiares. Todos los polimorfismos identificados por secuenciación fueron detectados por HRM. En la primera y segunda columna se enumeran los polimorfismos por el nombre actual del cambio en el ADN codificante (ADNc) y en la proteína, respectivamente, según la nomenclatura establecida por la Human Mutation Variation Society (<http://www.hgvs.org>). En la tercera columna se indica, cuando el polimorfismo tiene uno asociado, el número de referencia de SNP. Todos los polimorfismos han sido detectados en heterocigosis.

hom: polimorfismos que han sido detectados en homocigosis.

Tabla 4 Detección de variantes en el gen *CFTR* mediante HRM comparada con los test Innolipa y Devyser en el diagnóstico de pacientes FQ

Cambio en el ADNc	N.º de veces encontrada	HRM	Innolipa	Deyser
p.Gly85Glu	1	Sí	Sí	Sí
p.Ile148Asn	1	Sí	Sí	-
c.579 + 1G > T	1	Sí	Sí	Sí
p.Leu206Trp	1	Sí	-	Sí
p.Val232Asp	1	Sí	-	Sí
p.Gly253Arg	1	Sí	-	-
p.Glu279Asp	1	Sí	-	-
p.Arg334Trp	8	Sí	Sí	Sí
p.Ala349Val	1	Sí	-	-
p.Trp361Cysfs*8	1	Sí	-	-
p.Leu365Pro	1	Sí	-	-
c.1210-12(5 T)	16	Sí	Sí	Sí
p.Gly451Val	1	Sí	-	-
c.1393-2A > G	1	Sí	-	-
p.Ile507del	5	Sí	Sí	Sí
p.Phe508del	46	Sí	Sí	Sí
p.Gly542*	13	Sí	Sí	Sí
p.Arg553*	5	Sí	Sí	Sí
c.1680-1G > A	1	Sí	Sí	Sí
p.Ala561Glu	1	Sí	-	-
p.Gly576Ala	1	Sí	-	-
p.Met607_Gln634del	2	Sí	-	-
p.Arg668Cys	2	Sí	-	-
p.Gly673*	2	Sí	-	-
p.Lys684Thrfs*4	1	Sí	Sí	Sí
p.Lys684Serfs*38	2	Sí	-	Sí
p.Gln685Thrfs*4	1	Sí	-	Sí
p.Asn825Thrfs*5	1	Sí	-	-
p.Leu863Val	1	Sí	-	-
c.2657 + 5G > A	4	Sí	Sí	Sí
p.Gln890*	2	Sí	-	Sí
p.Tyr913Cys	1	Sí	-	-
p.Tyr913*	1	Sí	-	Sí
p.Tyr919*	1	Sí	-	-
c.2988 + 1G > A	1	Sí	Sí	Sí
p.Ser1045tyr	2	Sí	-	-
c.3140-26A > G	5	Sí	Sí	Sí
p.Phe1052Val	1	Sí	-	-
p.Arg1066Cys	1	Sí	-	Sí
p.Tyr1092*	2	Sí	-	Sí
p.Gln1100Pro	1	Sí	-	Sí
p.Gly1125*	1	Sí	-	-
p.Asp1152Hys	1	Sí	-	-
c.3717 + 1G > A	2	Sí	-	-
p.Trp1282*	4	Sí	Sí	Sí
p.Asn1303Lys	6	Sí	Sí	Sí

Cuarenta y seis mutaciones diferentes en el gen *CFTR* fueron previamente identificados por secuenciación en 73 ADNs procedentes de pacientes de FQ.

los muestran a 64,9 °C y 62,3 °C respectivamente. Los heterodúplex 5 T/7 T, 5 T/9 T y 7 T/9 T mostraron dos picos, uno a cada temperatura representando la combinación de ambos alelos.

La sensibilidad de los test comerciales Innolipa CFTR y Devyser Core+Iberia para la detección de las mutaciones analizadas, comparada con la sensibilidad del HRM, se

muestra en las [tablas 4 y 5](#). Este estudio comparativo se ha realizado solamente con las mutaciones identificadas en los ADN procedentes de los 73 pacientes caracterizados clínicamente como enfermos FQ. Puede verse que frente a un 100% de sensibilidad para detectar mutaciones del HRM la sensibilidad de los test Innolipa y Devyser para detectar las mismas mutaciones es 75,6 y 82,7% respectivamente.

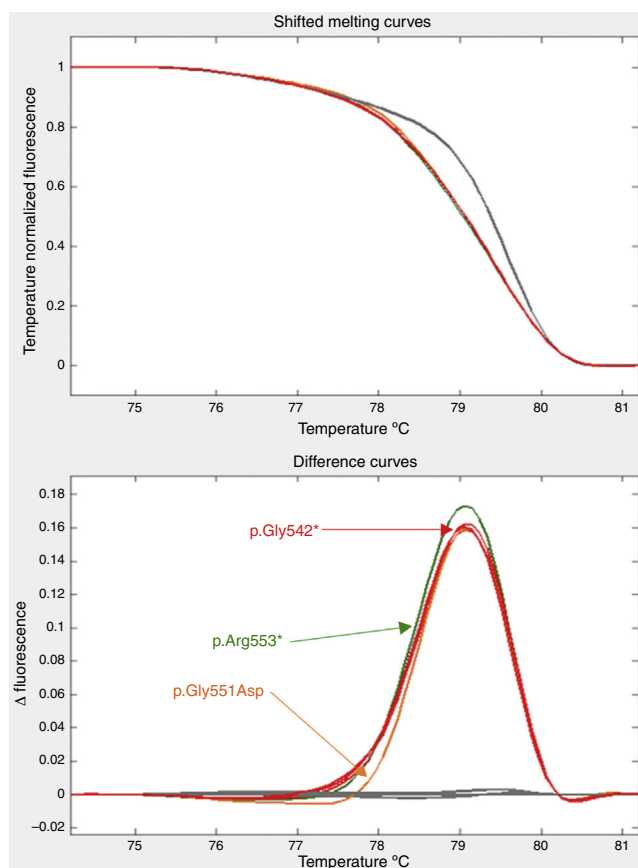


Figura 1 Perfil de HRM del exón 12 del gen *CFTR* en portadores FQ y controles. El análisis de HRM se llevó a cabo como se describe en Material y métodos, amplificando el exón 12 y regiones contiguas de los intrones 11 y 12 del gen *CFTR* en 4 individuos control, 3 portadores heterocigotos de la mutación p.Gly452*, uno portador heterocigoto de la mutación p.Arg553* y uno portador heterocigoto de la mutación p.Gly551Asp.

Tabla 5 Sensibilidad del HRM en el diagnóstico de FQ en comparación con los métodos de análisis de mutaciones Devyser e Innolipa. Estudio comparativo realizado en pacientes FQ

Método de análisis	Pacientes caracterizados	% Sensibilidad (95% IC)
HRM	68/73	93,2% (84,7-97,7)
Deyser	51/73	69,9% (58,0-80,1)
Innolipa	38/73	52,1% (40,0-63,9)

En consecuencia, el HRM también proporciona una importante mejora en la caracterización de pacientes frente a los kits comerciales. La sensibilidad diagnóstica en la población FQ estudiada fue del 93%, mientras que para Devyser fue del 69,9% y para el Innolipa del 52,1% (tabla 5).

Discusión

De los resultados presentados en este trabajo podemos concluir que la técnica de HRM es muy sensible en el objetivo de detectar variantes de ADN (mutaciones y polimorfismos)

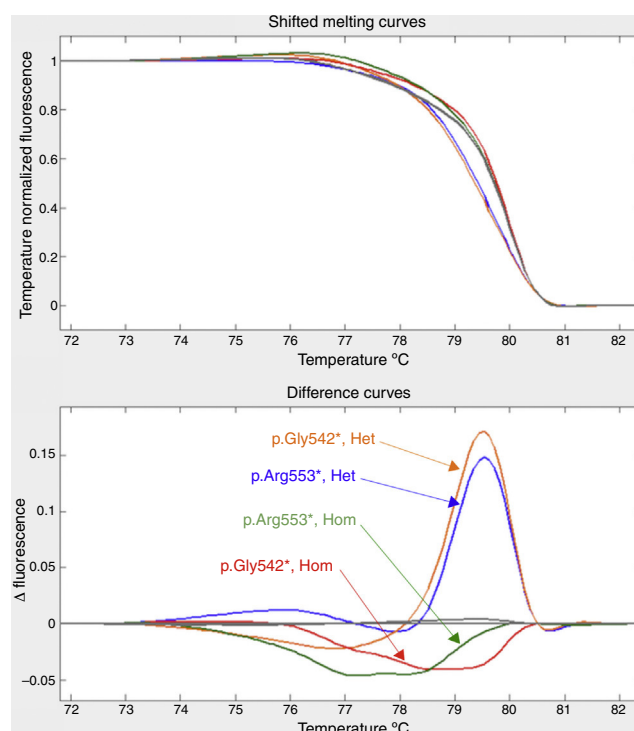


Figura 2 Perfiles de HRM del exón 12 para las mutaciones p.Gly542* y p.Arg553* en heterocigosis y homocigosis.

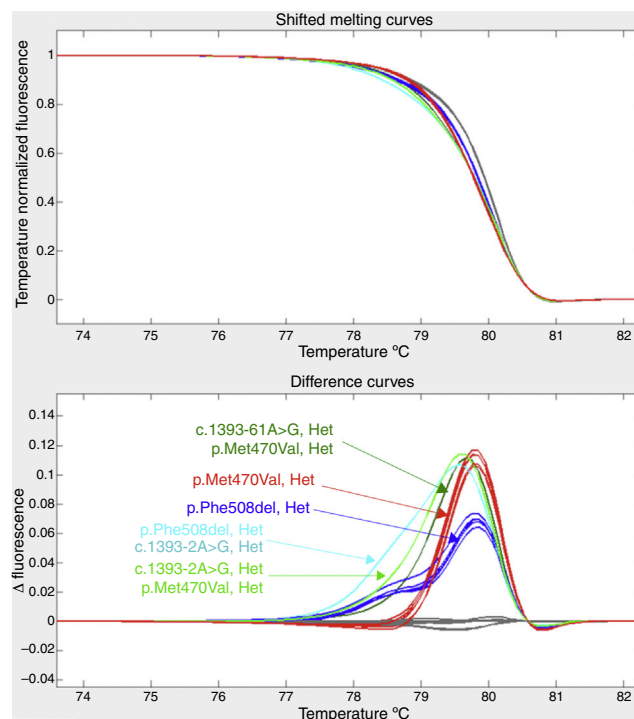


Figura 3 Perfil de HRM del exón 11 del gen *CFTR* en pacientes FQ y controles. El análisis de HRM se llevó a cabo como se describe en Material y métodos, amplificando el exón 11 y zonas contiguas de los intrones 10 y 11 del gen *CFTR* en 8 individuos control, 4 portadores heterocigotos de la mutación p.Phe508del y un portador heterocigoto de la mutación c.1393-2A > G.

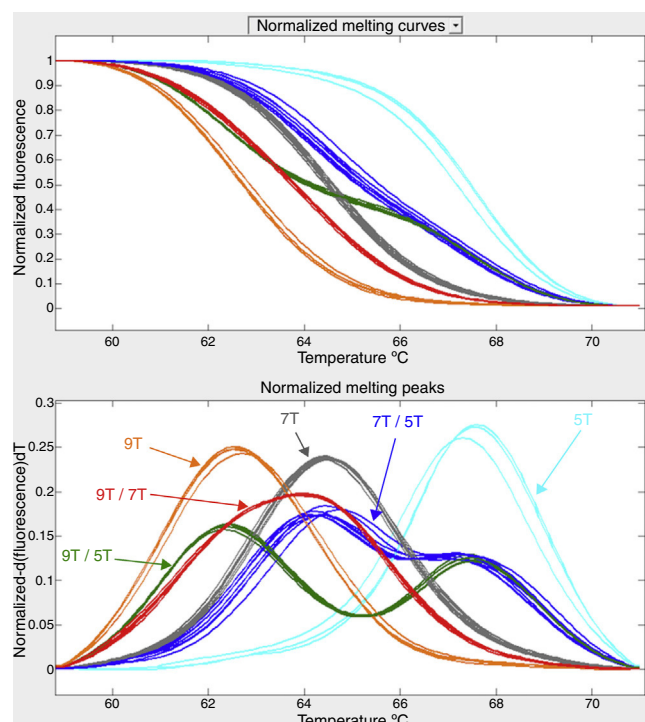


Figura 4 Perfil de HRM del extremo 3' del intrón 9 del gen *CFTR*. Utilizando un oligonucleótido de 5 timinas como sonda, y después de amplificar por PCR el exón 10 y zonas contiguas de los intrones 9 y 10 del gen *CFTR*, se analizaron por HRM 23 ADN de individuos portadores de distintas variantes del polimorfismo 9 T/7 T/5 T localizado en el extremo 3' del intrón 9 del gen *CFTR*. Se puede observar que la técnica discrimina entre las distintas variantes, tanto en homocigosis como en heterocigosis.

en el gen *CFTR*. Todas las mutaciones identificadas por la técnica de secuenciación de Sanger, que en principio es la técnica más sensible para detectar variantes de una o pocas bases en la secuencia de ADN, fueron detectadas por HRM en las condiciones empleadas. La técnica detectó incluso algunas mutaciones en homocigosis, condición en la que no se forman heterodúplex entre los dos alelos y por tanto menos probable que se altere el perfil de melting en HRM. Entre las mutaciones que se detectaron en homocigosis está la mutación F508del, la más frecuente entre la población de enfermos FQ de origen caucásico. Este último aspecto es importante ya que el genotipo F508 del homocigoto es un 25% en la población española de pacientes FQ. Frecuentes también, aunque en menor grado, son los pacientes homocigotos para la mutación p.Gly542*, situación que también detecta el HRM. A pesar de que en este trabajo fue posible detectar el 100% de las mutaciones en homocigosis analizadas ha habido otros autores que han publicado la no detección de algunas mutaciones en homocigosis, entre ellas la más frecuente, p.Phe508del¹⁵. Una estrategia recomendable a seguir con pacientes descendientes de padres consanguíneos es hacer la mezcla del ADN del paciente con un ADN control que generará la formación de heterodúplex, más fácilmente detectables por HRM.

Otro de los objetivos de este trabajo ha sido comparar la técnica de HRM con dos de los test comerciales en uso (Innolipa y Devyser) con el fin de analizar las ventajas

y desventajas de cada método. La sensibilidad de los dos test comerciales analizados está basada en la suma de frecuencias de aparición de las mutaciones más frecuentes en pacientes de fibrosis quística. El test de Innolipa ha considerado únicamente las mutaciones más frecuentes en Estados Unidos y norte de Europa¹⁶, mientras que el test Devyser ha incorporado a las anteriores algunas de las mutaciones que aparecen con relativa frecuencia en la población española¹⁷. Las sensibilidades de los test para la población española han sido facilitadas por las empresas fabricantes y han sido calculados en base a la suma de las frecuencias de cada una de las mutaciones incluidas en el test, que a su vez se han tomado de los datos aportados por las series con mayor número de casos estudiados. En la serie aquí estudiada las sensibilidades de los test comerciales son ligeramente inferiores a las esperadas pero hay que tener en consideración que nuestra serie sobre 73 pacientes es muy inferior en número de pacientes a las series de donde se ha tomado la frecuencia de mutaciones que ha servido para calcular las sensibilidades de los test.

La técnica de HRM no detecta grandes deleciones ni duplicaciones. Para este tipo de mutaciones la técnica de elección es el Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Además el diseño de amplicones del gen *CFTR* para HRM obligó a evitar algunas regiones que incluían secuencias repetidas que hubiesen complicado el análisis excesivamente. Esto hace que la sensibilidad diagnóstica de la técnica no sea del 100% si no que sea del 93%.

El HRM según nuestros resultados es más sensible que los test comerciales aunque, al ser una técnica de rastreo, no identifica la mutación sino que solamente la detecta, siendo necesaria, posteriormente, la secuenciación de los amplicones con perfil anómalo. No solo las mutaciones que causan la enfermedad darán un perfil anómalo sino que es previsible la aparición de perfiles anómalos en algunos amplicones que sean debidos a polimorfismos frecuentes en el ADN. Por tanto, para el análisis de *CFTR* de cada paciente será necesario secuenciar, de media, 6 amplicones por ADN, a menos que el perfil de HRM para cada polimorfismo de ADN esté suficientemente estandarizado y pueda obviarse secuenciar aquellos amplicones con perfil anómalo previamente identificados como polimorfismos. También es necesario que con cada muestra problema y para cada amplicón se analicen al menos 6 controles, para que el perfil HRM anómalo, si existe, resalte sobre los controles. Todo esto hace que la optimización de la técnica sea laboriosa y que aumenten los costes del análisis por ADN problema. Teniendo en cuenta solamente el coste en reactivos (máster mix para HRM y reactivos para secuenciación del ADN) y amortización del instrumento específico para realizar el HRM (Lightscanner, Idaho, 20.000 euros) el coste total por paciente sería de 76 € euros. Este coste estaría en el rango aproximado del coste por paciente para cualquiera de los dos test comerciales ensayados en este estudio.

Aunque el objetivo es el mismo, diagnosticar a pacientes con sospecha de padecer FQ, la utilización de kits comerciales por un lado o de técnicas de rastreo como la HRM por otro son dos estrategias diagnósticas diferentes. Los test comerciales aquí comparados tienen una sensibilidad para detectar al menos una mutación en el 75-85% de los pacientes con FQ y para detectar las dos mutaciones aproximadamente en el 65% de los pacientes.

En los últimos años la aparición de la secuenciación masiva o secuenciación de NGS ha impactado de forma importante en el diagnóstico de multitud de enfermedades y también de la FQ¹⁸. La NGS permite obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido, con lo que se prevé que en un futuro pueda desplazar a los métodos moleculares clásicos. Es una técnica de análisis basada en reacciones de PCR multiplex y en la secuenciación masiva en paralelo. Sin embargo, el coste actual de la NGS es todavía elevado para poderla aplicar al diagnóstico de la FQ. Además es necesario que se desarrollen programas de bioinformática para el análisis de los resultados, que todavía es muy complejo, y algoritmos más precisos para la predicción de patogenicidad de las variantes encontradas.

La combinación de cualquiera de los dos kits con la secuenciación NGS para aquellos pacientes en los que no se haya llegado al diagnóstico genético definitivo será una excelente solución una vez que los costes de la NGS se hayan abaratado suficientemente. La alternativa a la estrategia anterior es la utilización de la técnica de HRM seguida de la secuenciación por el método Sanger de aquellos amplicones con perfil anómalo. La HRM requiere de una optimización previa que se ve compensada por su elevada sensibilidad.

Financiación

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca de la Fundación «José Luís Castaño» 2013 a Tegra Barreiro Martínez.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Dr. Jesús Molano por su ayuda en la elaboración del manuscrito. Los autores agradecen la ayuda técnica de Rubén de Sancho y Amparo García Cardenal en la realización de este trabajo. Nuestro agradecimiento también al Dr. Ángel Campos por sus consejos y acertadas observaciones.

Bibliografía

1. Cystic Fibrosis Mutation Database. US Cystic Fibrosis Foundation. Toronto. 25/4/2011 [consultado 30 May 2015]. Disponible en: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
2. Boucher R. C. Fibrosis quística. En: Harrison-Braunwald <Ed.> Principios de Medicina Interna. 15. ed. Madrid: Harrison-Braunwald McGraw-Hill Companies, Inc. 1999.
3. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2013. Annual report. Bethesda, Maryland. Cystic Fibrosis Foundation [consultado 30 May 2015]. Disponible en: https://www.cff.org/2013_CFF_Patient_Registry_Annual_Data_Report.pdf.
4. Davis PM. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(5):475-82. Publicación electrónica 2005 26 Ago. Revisión.
5. Del Ciampo IR, Oliveira TQ, del Ciampo LA, Sawamura R, Torres LA, Augustin AE, et al. Early manifestations of cystic fibrosis in a premature patient with complex meconium ileus at birth. *Rev Paul Pediatr*. 2015;33:241-5.
6. Wilcken B, Wiley V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4:272-7.
7. Langen AV, Dompeling E, Yntema JB, Tiddens H, Loeber G, Dankert-Roelse J. Clinical evaluation of the Nanoduct sweat test system in the diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening. *Eur J Pediatr*. 2015 Feb 13. [Publicación electrónica].
8. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. 2003 Mar;49:396-406.
9. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003 Jun;49 6 Pt 1:853-60.
10. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros*. 2011;10 Suppl 2:S86-102.
11. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153:S4-14.
12. Primer3: WWW primer tool. Steve Rozen, Helen J. Skaltsky. Whitehead Institute for Biomedical Research [consultado 30 May 2015]. Disponible en: <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3-www.cgi>
13. Oligo Analyzer 3.1. IDT. Integrated DNA Technologies. 2015 [consultado 30 May 2015]. Disponible en: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
14. SNPCheck National Genetic Reference Laboratory. Manchester. 8/5/2014 [consultado 30 May 2015]. Disponible en: <https://secure.ngml.org.uk/SNPCheck/snpcheck>
15. Audrezet MP, Dabiric A, Le Marechal C, Ferec C. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn*. 2008;10:424-34.
16. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002 Jun;19:575-606.
17. Alonso MJ, Heine-Suñer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD, et al. Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet*. 2007 Mar;71 Pt 2:194-201.
18. Trujillano D, Ramos MD, González J, Tornador C, Sotillo F, Escaramis G, et al. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and CFTR-related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of CFTR. *J Med Genet*. 2013;50:455-62.