

plex (bc2-GUS $\beta$ ) permitieron el análisis de 14 pacientes PML-RARA positivos y 5 PML-RARA negativos al diagnóstico. Las características biológicas y moleculares se resumen en la Tabla 1. En todos los casos, el ARN fue extraído por el kit Qiagen® RNeasy Mini Kit y la RT-PCR fue realizada según el protocolo Biomed. Los ensayos RT-Q-LAMP PML-RARA han sido correctamente amplificadas en todas las muestras, mostrando resultados concordantes con la RT-PCR. Además, el ensayo de RT-Q-LAMP fue capaz de amplificar también muestras con una baja concentración (27 ng/ul) y 5 muestras negativas recogidas al seguimiento.

**Conclusiones:** El ensayo fluorescente RT-Q-LAMP para la detección del transcrito de fusión PML-RARA es altamente específico, sensible y rápido. La rapidez y la especificidad de RT-Q-LAMP junto a la elevada robustez incluso en muestras con baja concentración de ARN, permite un diagnóstico rápido, evitando repetir el análisis como puede ocurrir en el caso de la RT-PCR. Estas características aumentan la fiabilidad de los resultados obtenidos y hace el sistema apropiado no solo para los laboratorios especializados. Por tanto, el método RT-Q-LAMP PML-RARA puede mejorar el diagnóstico de los pacientes con LPA, disminuyendo el riesgo de complicaciones hemorrágicas mediante la administración de un tratamiento rápido.

### CO-093

#### CARACTERIZACIÓN DE LA PÚRPURA TROMBÓTICA TROMBOCITOPÉNICA CONGÉNITA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES: RESULTADOS DE LA COLECCIÓN NACIONAL DEL GEPTT

Liquori A<sup>1</sup>, Moret A<sup>2</sup>, Martínez Revuelta E<sup>3</sup>, Moreno JA<sup>4</sup>, Goterris R<sup>5</sup>, Arbona C<sup>5</sup>, Marín Sánchez A<sup>6</sup>, Del Río J<sup>7</sup>, Oliva A<sup>8</sup>, Ibañez Company M<sup>9</sup>, Such Taboada E<sup>9</sup>, González Romero E, Boluda Navarro M, Morote Faubel M, Martínez Valiente C, García Ruiz C, Sanjuán-Pla A, Rosón Burgo B, Sanz Alonso MA<sup>10</sup>, Sanz Santillana G<sup>9</sup>, Zúñiga A<sup>2</sup>, Cervera Zamora J<sup>\*11</sup>, Gómez-Seguí I<sup>\*12</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Hematología. IIS La Fe, Valencia.; <sup>2</sup>Unidad de Genética HUyP La Fe, Valencia.; <sup>3</sup>Hospital Universitario Central de Asturias.; <sup>4</sup>HCU Lozano Blesa, Zaragoza.; <sup>5</sup>Hospital Clínico de Valencia.; <sup>6</sup>Hospital General de Albacete.; <sup>7</sup>Complejo Hospitalario Universitario Ourense.; <sup>8</sup>Hospital Virgen de la Candelaria, Tenerife.; <sup>9</sup>Servicio de Hematología, HUyP La Fe, Valencia. CIBER de oncología (CIBERONC).; <sup>10</sup>Grupo de Investigación en Hematología. IIS La Fe, Valencia. CIBER de oncología (CIBERONC).; <sup>11</sup>Unidad de Genética HUyP La Fe, Valencia. \*igual contribución.; <sup>12</sup>Servicio de Hematología, HUyP La Fe, Valencia. CIBER de oncología (CIBERONC). \*igual contribución

**Introducción:** La Púrpura Trombótica Trombocitopénica congénita (PTTc) es una enfermedad ultra-rara caracterizada por un déficit severo de la enzima ADAMTS13 como consecuencia de mutaciones heredadas de forma autosómica recesiva en el gen *ADAMTS13* (9q34). En este estudio, desarrollado dentro del Grupo Cooperativo Español de PTT (GEPTT), se ha llevado a cabo la creación de una colección centralizada de muestras biológicas y su caracterización inmunológica y molecular para mejorar el diagnóstico y el manejo clínico de los pacientes.

**Métodos:** Se incluyeron en este estudio seis pacientes con diagnóstico clínico o sospecha de PTTc de diferentes hospitales españoles. Se estudió la actividad de ADAMTS13 e inhibidores mediante la técnica ELISA con el kit "TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity e INH" (Technoclone). Además, se realizó test Bethesda para descartar la presencia de inhibidores no IgG. Para el estudio genético, se implementó un panel de captura (*SureSelect, Agilent*) dirigido a la región genómica completa, incluyendo también las regiones no codificantes, del gen *ADAMTS13* (chr9: 136278459 - 136325025, *hg19*). Las librerías de DNA se secuenciaron con la plataforma *MiSeq* (Illumina®) y el posible efecto patogénico de las variantes identificadas se estudió a nivel de i) proteína, utilizando predictores de cambio de aminoácido (SIFT) y de estructura de la proteína (SwissModel) y ii) *splicing*, con herramientas de análisis *in silico* (HSF) y validación funcional *in vitro* mediante *minigenes*. En 3 casos se realizó un cariotipo molecular utilizando *array* de SNPs (*CytoScan HD, Affymetrix*) para detectar regiones de pérdida de material genético y/o de heterocigosidad (LOH).

**Resultados:** La mediana de actividad de ADAMTS13 fue de 1,1% (rango 0 - 3,2) y la presencia de inhibidores (ELISA y Bethesda) fue negativa en todos los casos. Se hallaron variantes potencialmente patogénicas en todos los casos (2 heterocigotos compuestos y 4 homocigotos). Cuatro de las ocho variantes identificadas (6 missense, 1 sinónima, 1

de *splicing*) no se habían descrito previamente. Aunque no se observaron mutaciones recurrentes o regiones *hotspot*, el cambio de cisteína en tirosina (p.C508T, p.C977T, p.C1007T) fue el más frecuente (3/6 missense), así como las mutaciones en el dominio "trombospondina tipo 1" (TSP 1-8) (4/8 variantes). Además, los análisis *in silico* destacaron 2 nuevas variantes que podrían alterar el *splicing* de *ADAMTS13*, como consecuencia de la ruptura (c.988-2A>G) y de la creación de un sitio de *splicing* (p.G1423G). Para evaluar la posible presencia de una disomía uniparental en los casos homocigotos para todo el gen (n = 3) y no disponiendo de muestras para realizar la segregación familiar, se realizó un *array*. Éste confirmó una LOH común (5 Mb) en la región que incluye *ADAMTS13* (9q34.11q34.3). Sin embargo, la presencia de LOH también en otras regiones, permitió asociar estas alteraciones a consanguinidad no conocida.

**Conclusiones:** Este trabajo demuestra la utilidad de realizar un estudio centralizado e integrado de una enfermedad ultra-rara como la PPTc. El análisis del gen completo, nos ha permitido identificar 4 nuevas variantes, entre ellas la que podría ser la primera mutación sinónima descrita en PPTc. Además, se ha podido identificar una región de homocigosidad que incluye el gen *ADAMTS13* en la mitad de los pacientes, lo que podría ser frecuente en la PPTc española.

Estudio financiado por las ayudas FEDER CB16/12/00284, PI16/00665, PI16/01113, PT17/0015/0043, PI18/1472; PROMETEIOII/2015/008, ACIF/2018/256; GVA/2018/004; Becas Predoctorales JAP de Valencia de la AECC, FEHH: 2017-2018; 2018-2019. Agradecemos la colaboración del Biobanco La Fe.

### CO-094

#### SECUENCIACIÓN POR NANOPOROS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES ESTRUCTURALES: FORTALEZAS Y DEBILIDADES

De la Morena-Barrio B<sup>1</sup>, Martínez E<sup>2</sup>, Padilla J<sup>1</sup>, Abad-Navarro F<sup>2</sup>, García-Hernández JL<sup>3</sup>, De la Morena-Barrio ME<sup>1</sup>, Bernabé-Díaz JA<sup>4</sup>, Esteban-Gil A<sup>5</sup>, Pérez F<sup>4</sup>, Miñano A<sup>1</sup>, Bravo C<sup>1</sup>, Vidal F<sup>6</sup>, Fernández-Breis JT<sup>4</sup>, Hernández-Rivas JM<sup>7</sup>, Vicente V<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia.; <sup>2</sup>Departamento de Informática y Sistemas, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia.; <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Salamanca, Salamanca.; <sup>4</sup>Departamento de Informática y Sistemas, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia.; <sup>5</sup>Biomedical Informatic and Bioinformatics Platform, IMIB-Arrixaca, Murcia.; <sup>6</sup>Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona (VHIR-UAB), Barcelona.; <sup>7</sup>Hospital Virgen de la Salud, Toledo

**Introducción:** El desarrollo de métodos de secuenciación masiva ha revolucionado el estudio molecular de enfermedades genéticas. Sin embargo las técnicas más empleadas realizan secuencias pequeñas, y por ello tienen grandes limitaciones para identificar grandes alteraciones estructurales (deleciones, inserciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones), cuyo peso en la base molecular de múltiples patologías podría estar subestimado. En 1996 se comenzó a desarrollar un nuevo método de secuenciación masiva basado en los cambios eléctricos que provoca el ADN al pasar por nanoporos. Esta técnica, que permite lecturas ultra largas, es idónea para la identificación y caracterización de variantes estructurales (Jain *et al.* Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat Biotechnol.* 2018;36:338-345).

**Objetivos:** Evaluar la utilidad de la secuenciación por nanoporos en la detección de variantes estructurales causantes de la deficiencia de anti-trombina, una enfermedad monogénica en la que hasta el 70% de los casos se deben a variantes patogénicas puntuales en *SERPINC1*.

**Métodos:** El estudio se realizó en 3 pacientes con deficiencia de anti-trombina sin mutaciones en *SERPINC1* analizado mediante secuenciación Sanger o NGS pero con variantes estructurales (deleciones) detectadas por MLPA y/o Long Range-PCR. En todos los casos se realizó un *array* de CGH (aCGH) (*CytoScan® HD*). La secuenciación de ADN genómico, se realizó empleando Oxford Nanopore Technologies con un dispositivo MinION (Figura 1).

**Resultados:** La secuenciación del genoma humano completo (11,6 Gb de media) con una cobertura media de 3X, se realizó en tres días, sin equipamiento especializado (Figura 1), y con un coste de 800€ por muestra. La longitud media de las lecturas fue de 7.887 pb, siendo la secuen-