

Análisis *in silico* de la Reacción de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle de Transcripción Inversa (RT-LAMP) para la identificación del Virus del Dengue (*Orthoflavivirus denguei*) en Colombia

Natalia Andrea Ortiz Salamanca

Trabajo de Grado para Optar el Título de Bióloga

Director

Francisco José Martínez Pérez

Doctor en ciencias Biológicas

Codirector

Cristian Enrique Cadena Caballero

Biólogo

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

Al supremo por ponerme en el momento justo y preciso para que todo se diera.

A mis padres: a *Gerardo*, por confiar siempre en mí. A *Hildegard*, por enseñarme con su ejemplo a nunca rendirme.

A *Maty*, por su amor y dedicación hacia todos, por ser la base y el corazón de nuestra familia.

A *Raul* por simplemente ser el líder que lo inició todo.

A *Gerardo* y *Lolita*, por cada oración y palabra de aliento.

A toda mi familia, porque son la luz que guía mi camino.

A *Geimy* por siempre escucharme y ser la hermana que la vida me dio.

A *Camilo*, por hacerme volver a creer en mí, por siempre dejarme ser y llegar a iluminar mi vida, por construir nuestro hogar.

A *Yina* por su apoyo siempre.

A mi apoyo incondicional, *Vicky*, por tener la fortaleza de lograrlo juntas;

A *Ari*, por ser siempre un rayito de sol en nuestras vidas

A *Lucía*, por ser mi refugio emocional y escucharme siempre.

A *Juli*, mi hada de los trabajos, por creer en mí una y otra vez;

A *Jeimmy* y su familia, por abrirme las puertas de su hogar y adoptarme en los primeros años de carrera.

A todos los amigos que la biología me dejó, simplemente gracias.

A *Mafe* por siempre darme moral desde hace 10 años y a *Sheki* por ser mi compañera de vida.

A los miembros de la Empresa SDS Logistics, a *Tom* y *Andy*, por su paciencia, apoyo y confianza, incluso a casi 4000 kilómetros de distancia; y a *Dany*, *Ricky*, *Diandra*, *Silvia* y *Eberth*, por ser los mejores compañeros y escuchar mis exposiciones una y otra vez con cariño y humor.

A mis niños *Caramelo*, *Darky* y *Pepper*, por acompañarme con su amor incondicional.

A bebé *Castillo Ortiz* creciendo en mí, porque todos mis logros son para ti.

Finalmente, a la Natalia de 2017: *sí se pudo*.

Agradecimientos

A la Convocatoria Interna de Investigación, con Aporte en Efectivo de la E.S.E. Hospital Universitario de Santander 2024, Colombia y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander con el proyecto 8078, quienes proporcionaron los recursos para el desarrollo de esta pasantía de investigación.

Al Profesor Francisco Martínez Pérez, por la oportunidad de hacer parte de este trabajo, por toda su paciencia y compromiso con cada uno de sus estudiantes, por ser amigo y mentor. Al Biólogo Cristian Cadena por su mentoría y enseñanzas durante todo este proceso. A los biólogos Yordy, Luis y Cristina por sus asesorías y a todo el semillero COBIFMAP por escucharme y permitirme hacer parte de él.

A la Universidad Industrial de Santander.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander.

A la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

Al grupo de Computo Avanzado y a Gran Escala (CAGE) y Microbiología y Genética.

A todas las personas que me brindaron su apoyo y confianza, mil gracias.

A todos ustedes lectores.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos	21
1.1 Objetivo General	21
1.2 Objetivos Específicos	21
2. Competencias	22
2.1 Cognitivas	22
2.2 Actitudinales	22
3. Método	23
3.1 Obtención y selección de secuencias del Virus del Dengue	23
3.1.1 Filtrado de secuencias del Virus del Dengue obtenidas en el GenBank	24
3.2 Alineamientos y obtención de secuencias consenso para el diseño de los juegos de cebadores	25
3.2.1 Alineamientos de las secuencias del Virus del Dengue	25
3.2.2 Consensos obtenidos por serotipo para el diseño de cebadores para RT-LAMP	27
3.3 Obtención y diseño de cebadores para los cuatro serotipos del Virus del Dengue	28
3.4 Selección y análisis de juego de cebadores para los cuatro serotipos del Virus del Dengue	29

4. Resultados:	30
4.1 Obtención y selección de secuencias del Virus del Dengue	30
4.1.1 Alineamientos de las secuencias del Virus del Dengue	34
4.1.2 Consensos obtenidos por serotipo para el diseño de cebadores para RT-LAMP	36
4.2 Obtención y diseño de cebadores para los cuatro serotipos del Virus del Dengue	37
4.2.1 Selección y análisis de juego de cebadores para los cuatro serotipos del Virus del Dengue	38
4.3 Validación <i>in silico</i> de los juegos de cebadores Seleccionados para la identificación del Virus del Dengue	44
5. Discusión de resultados	48
6. Conclusiones	55
7. Recomendaciones	57
Referencias bibliográficas	58

Lista de Tablas

	Pag.
Tabla 1. Secuencias genómicas completas del Virus del Dengue obtenidas del GenBank por país y serotipo	31
Tabla 2. Total de secuencias conservadas por país y serotipo después de aplicar filtros de calidad y verificación por alineamiento	32
Tabla 3. Total de secuencias conservadas por país después de los dos filtros de depuración por calidad y verificación por alineamiento	34
Tabla 4. Comparación del porcentaje de variabilidad entre los alineamientos obtenidos de Suramérica con respecto a los de Colombia, Venezuela y Ecuador.	36
Tabla 5. Sets de cebadores RT-LAMP diseñados para los serotipos del Virus del Dengue en relación con el número de segmentos de 1.500 pb utilizados para su diseño	39
Tabla 6. Resumen de la validación <i>in silico</i> de los cebadores seleccionados para cada serotipo	46
Tabla 7. Análisis fisicoquímico oligoanalyzer	49

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 1. Curso del Virus del Dengue: Fase Febril, Crítica y de recuperación	14
Figura 2. Esquema del funcionamiento de la técnica LAMP.	18
Figura 3. Cálculo de porcentaje de variabilidad en los alineamientos	26
Figura 4. Obtención y distribución de los cebadores F3, B3, FIP, BIP y sus regiones internas F2, F1c, B2, B1c dentro de la secuencia blanco para la reacción RT- LAMP.	29
Figura 5. Se muestra un ejemplo de cómo con BLAST se identifica una secuencia de DENV-2, que se encuentra más relacionada con DENV-1.	33
Figura 6. Se muestra a manera de ejemplo, el alineamiento con alta variabilidad para el serotipo 2 del virus de dengue.	37
Figura 7. Secuencias de Colombia, Ecuador y Venezuela alineadas para el serotipo DENV-2. La cual presenta mayor homogeneidad y regiones conservadas	37
Figura 8. Generación de consensos a partir de los alineamientos obtenidos para DENV-4 en la herramienta BioEdit. Este procedimiento se replicó para cada serotipo.	38
Figura 9. Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-1, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción.	41
Figura 10. Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-2, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción.	42
Figura 11. Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-3, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción.	43
Figura 12. Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-4, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción.	44
Figura 13. Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma para RNasaP, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción.	45

Lista de Apéndices

Apéndice A. Obtención y selección de secuencias.

Apéndice B. Secuencias depuradas.

Apéndice C. Secuencias validadas.

Apéndice D. Alineamientos correspondientes a cada serotipo en los 11 países

Apéndice E. Secuencias consenso correspondientes a los serotipos DENV-1 a DENV-4 por cada país.

Apéndice F. Cebadores obtenidos por serotipo.

Apéndice G. Comparación de juegos de cebadores seleccionados frente a secuencias de referencias.

El enlace a los apéndices de este trabajo: <https://zenodo.org/records/18343389>

Glosario

Análisis *in silico*: Método de investigación que utiliza la computación y las simulaciones por computadora para analizar y predecir el comportamiento de moléculas y sistemas biológicos (Brogi et al., 2020).

Bioinformática: Disciplina interdisciplinaria integradora de la biología, la informática, la matemática y estadística para el almacenamiento, análisis e interpretación de datos biológicos complejos, especialmente aquellos derivados de secuencias genómicas, transcriptomas y proteómicas. Esta disciplina permite el análisis *in silico* de grandes volúmenes de información biológica facilitando la identificación, comparación de secuencias y diseño de herramientas moleculares (Lesk, 2019).

Cebadores: Son fragmentos cortos de ADN o ARN que actúan como puntos de inicio para la replicación o amplificación de una secuencia de ADN específica (Sambrook et al., 1989).

RT-LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle de Transcripción Inversa): Técnica de diagnóstico molecular que permite la detección y amplificación rápida de ARN viral mediante una reacción isotérmica a temperatura constante (entre 60-65 °C) sin requerir un termociclador. Combina la transcripción inversa con una amplificación altamente específica teniendo en cuenta el uso de múltiples cebadores dirigidos a regiones conservadas del genoma diana, lo que proporciona alta sensibilidad y rapidez en la obtención de sus resultados (Mori & Notomi, 2009; Notomi, 2000).

Serotipos: Son subgrupos de un microorganismo (como un virus o una bacteria) que se clasifican según sus características antigénicas (Mietzner et al., 2016).

Virus del Dengue (DENV): es un Orthoflavivirus de ARN que causa la enfermedad del dengue, transmitido por mosquitos principalmente del género *Aedes*, con cuatro serotipos que provocan desde síntomas leves tipo gripe hasta cuadros graves como fiebre hemorrágica y shock, afectando a millones en zonas tropicales y subtropicales, sin tratamiento específico más allá del manejo sintomático (Postler et al., 2023; Wilder-Smith et al., 2019).

Resumen

Título: Análisis *in silico* de la Reacción de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle de Transcripción Inversa (RT-LAMP) para la identificación del Virus del Dengue (*Orthoflavivirus denguei*) en Colombia

Autor: Natalia Andrea Ortiz Salamanca

Palabras Clave: Virus del Dengue, RT-LAMP, *in silico*, Bioinformática, Cebadores

El dengue constituye un reto creciente para la salud pública en Colombia, lo que refuerza la necesidad de herramientas diagnósticas moleculares rápidas, sensibles y operativamente viables. En este estudio se evaluó *in silico* la aplicabilidad de la técnica RT-LAMP para la identificación genómica de los cuatro serotipos del Virus del Dengue (DENV-1–DENV-4). Se recuperaron 1.159 secuencias genómicas completas desde GenBank correspondientes a 11 países de Suramérica y, tras un proceso de control de calidad y depuración taxonómica (exclusión de secuencias con nucleótidos ambiguos/gaps, longitudes no compatibles y discrepancias serotípicas), se consolidó un conjunto final de 794 secuencias para el análisis. Se realizaron alineamientos múltiples por serotipo y país, se estimó la variabilidad genética y se construyeron secuencias consenso (estrictas y mayoritarias), priorizando Colombia, Venezuela y Ecuador por su relevancia epidemiológica y circulación regional. A partir de ventanas de 1.500 pb en los consensos mayoritarios se diseñaron 112 sets de cebadores RT-LAMP mediante NEB® LAMP Primer Design Tool (DENV-1: 23; DENV-2: 32; DENV-3: 32; DENV-4: 25), seleccionando posteriormente un set representativo por serotipo en regiones altamente conservadas. La validación *in silico* mediante BLASTn evidenció alta concordancia con secuencias del serotipo objetivo y la evaluación frente a Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla no mostró compatibilidad completa consistente con amplificación RT-LAMP funcional. Adicionalmente, el análisis fisicoquímico (Guanina-Citocina, T_m y ΔG) indicó parámetros compatibles con criterios reportados para LAMP. En conjunto, estos resultados respaldan el diseño *in silico* como una etapa robusta para el desarrollo de ensayos RT-LAMP serotipo-específicos para dengue, cuya implementación requiere validación experimental y clínica.

Abstract

Title: *In silico* analysis of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction (RT-LAMP) for the identification of Dengue Virus (*Orthoflaviviridae denguei*) in Colombia

Author: Natalia Andrea Ortiz Salamanca

Key Words: Dengue Virus, RT-LAMP, *in silico*, Biomolecular, Primers

Dengue represents a growing challenge for public health in Colombia, which reinforces the need for rapid, sensitive, and operationally feasible molecular diagnostic tools. In this study, the *in silico* applicability of the RT-LAMP technique was evaluated for the genomic identification of the four dengue virus serotypes (DENV-1–DENV-4). A total of 1,159 complete genomic sequences were retrieved from GenBank, corresponding to 11 South American countries. After a quality control and taxonomic curation process (excluding sequences with ambiguous nucleotides/gaps, incompatible lengths, and serotype discrepancies), a final dataset of 794 sequences was consolidated for analysis. Multiple sequence alignments were performed by serotype and country, genetic variability was estimated, and consensus sequences (strict and majority) were constructed, prioritizing Colombia, Venezuela, and Ecuador due to their regional epidemiological relevance. From 1,500 bp windows within the majority consensus sequences, 112 RT-LAMP primer sets were designed using the NEB® LAMP Primer Design Tool (DENV-1: 23; DENV-2: 32; DENV-3: 32; DENV-4: 25). Subsequently, one representative primer set per serotype was selected in highly conserved regions. *In silico* validation using BLASTn showed high concordance with sequences from the target serotype, and evaluation against ZIKV, CHIKV, and YFV did not show complete compatibility consistent with functional RT-LAMP amplification. Additionally, physicochemical analysis (GC content, T_m , and ΔG) indicated parameters consistent with reported LAMP criteria. Altogether, these results support *in silico* design as a robust preliminary step for the development of serotype-specific RT-LAMP assays for dengue, whose implementation requires experimental and clinical validation.

Introducción

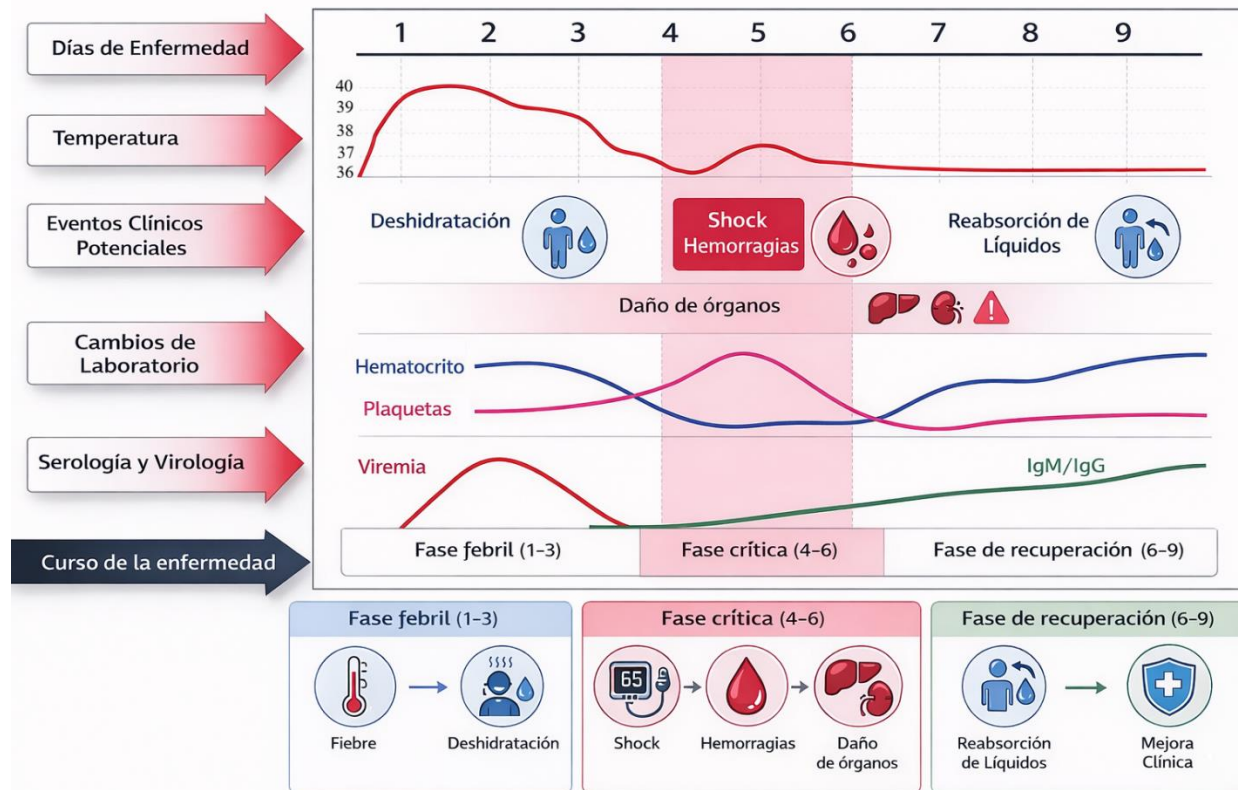
El dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus* (CDC, 2024) siendo el agente causal, un virus de ARN monocatenario de sentido positivo perteneciente a la familia *Flaviviridae* (género *Orthoflavivirus*, especie *Orthoflavivirus denguei*) (Hill et al., 2024; Postler et al., 2023; Wilder-Smith et al., 2019). En la actualidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 4 mil millones de personas viven en áreas con riesgo de transmisión del virus y se reportan alrededor de 390 millones de casos de infección, de los cuales entre 36,000 y 40,000 son fatales (CDC, 2024; OPS, 2025). Entre 2021 y 2024 se observó el pico mundial más alto de circulación la década, con aumentos sostenidos y más de 6,5 millones de casos confirmados (WHO, 2024), mientras que, en América Latina, se notificaron más de 13 millones de casos en 2024, lo que refleja una carga sin precedentes sobre los sistemas sanitarios (OPS, 2025).

El Dengue no cuenta con un tratamiento específico. La infección afecta a lactantes, niños y adultos, y puede presentarse en cuadros asintomáticos y sintomáticos de diversa intensidad (OPS, 2025). El curso de la enfermedad presenta tres fases después del periodo de incubación (Figura 1). En la Fase Febril (0 a 3 días), los pacientes suelen presentar fiebre alta repentina, enrojecimiento facial, eritema cutáneo, dolor corporal, mialgia, artralgia y cefalea. Además, también pueden presentarse manifestaciones hemorrágicas leves y agrandamiento del hígado después de unos días de fiebre. La Fase Crítica se presenta alrededor de los 3 a 7 días de infección. Durante esta fase se puede producir un aumento de la permeabilidad capilar, fuga plasmática y disminución de recuento plaquetario, alteraciones que suelen durar de 24 a 48 horas. Por último, la fase de recuperación: Si el paciente sobrevive a la fase crítica, se produce una reabsorción gradual del líquido del compartimento extravascular y se empieza a recuperar el bienestar general (WHO, 2009).

Figura 1.

Curso del Dengue: Fase Febril, Crítica y de recuperación

La figura muestra la evolución típica de la enfermedad del Dengue a lo largo de los días de desarrollo de la enfermedad, en donde en la fase febril predomina la fiebre elevada y viremia. La fase crítica se asocia con el aumento de la permeabilidad capilar y manifestaciones hemorrágicas y finalmente la fase de recuperación y reabsorción de líquidos en la cual se incrementa la respuesta inmunológica y se normalizan los parámetros hematológicos dando evidencia por anticuerpos IgM e IgG (OPS, 2015).



Nota. Curso clínico del dengue: fase febril, crítica y recuperación. Adaptado de la Organización mundial de la Salud (2009).

En Colombia la enfermedad es hiperendémica, con cuatro serotipos de DENV (DENV-1 a DENV-4) circulando simultáneamente, (Rivero et al., 2026; Rodríguez-Morales et al., 2025), en donde el serotipo que se ha consolidado como el más predominante en los últimos años es el serotipo DENV-2 (Calvo et al., 2026; Rodríguez-Morales et al., 2025). El Instituto Nacional de Salud (INS) informa que anualmente se reportan un promedio de 105,000 casos, aunque en 2024

la cifra preliminar alcanzó los 185,034 casos, muy por encima de los 132,673 casos del año anterior 2023 (INS, 2024). La tasa de letalidad durante la última década ha oscilado entre el 0,07% y el 0,16% (Rivero et al., 2026). Factores como el cambio climático, fenómenos como “El Niño”, la urbanización no planificada, la cobertura limitada de vacunación y sus criterios de elegibilidad y el control inadecuado de vectores han contribuido al aumento del número de casos y la propagación de la enfermedad a nuevas regiones geográficas (OPS, 2025).

De forma convencional, el dengue se puede diagnosticar mediante la detección directa de sus proteínas virales, el ácido nucleico, antígenos o mediante métodos serológicos (anticuerpos IgM/IgG), según la etapa clínica de la infección (Hill et al., 2024; WHO, 2009). Para el diagnóstico del Dengue en la fase aguda o crítica (0 a 7 días después de la aparición de los síntomas) las pruebas recomendadas son las pruebas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) como RT-PCR, así como pruebas para la detección del antígeno viral NS1 (proteína no estructural 1) y de anticuerpos IgM (inmunoglobulina M) mediante ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas), una técnica inmunológica utilizada para la detección cualitativa o cuantitativa de antígenos o anticuerpos, técnica utilizada de acuerdo con el momento clínico de la infección (CDC, 2024).

El estándar molecular para el diagnóstico en fase aguda es la RT-PCR; sin embargo, se ha descrito una alternativa operativa denominada amplificación isotérmica mediada por bucle con transcripción inversa (RT-LAMP, por sus siglas en inglés *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*), la cual se caracteriza por su rapidez, alta sensibilidad, simplicidad operativa y bajos requerimientos de equipamiento, lo que la hace particularmente adecuada para su implementación en entornos con recursos limitados (Notomi, 2000; Soroka et al., 2021; Subali & Wiyono, 2021). Además, diferencia de RT-PCR, la RT-LAMP no requiere ciclos térmicos,

opera a temperatura constante (60–65 °C) y permite resultados de amplificación en 30 a 60 min con un total del ensayo de hasta aproximadamente 2 horas (Becherer et al., 2020; Notomi, 2000).

Asimismo, la técnica RT-LAMP ha sido ampliamente desarrollada y aplicada para la detección del DENV, incluyendo estrategias dirigidas específicamente a cada uno de sus cuatro serotipos mediante el uso de conjuntos de cebadores únicos que permiten una detección sensible y específica de la infección (Arruda et al., 2024; Hurtado-Gómez et al., 2025; Lopez-Jimena et al., 2018). De hecho, estudios recientes han reportado su implementación en distintos contextos, incluyendo Colombia, demostrando su utilidad como herramienta diagnóstica rápida y viable en entornos con recursos limitados (Avenidaño & Patarroyo, 2020; Hurtado et al., 2022; Hurtado-Gómez et al., 2025). Posteriormente, se desarrollaron y optimizaron versiones colorimétricas de la RT-LAMP en donde, la amplificación se detecta mediante un cambio de color asociado a variaciones de pH generadas durante la síntesis del ADN, permitiendo la visualización directa de los resultados sin instrumentación especializada (Becherer et al., 2020; Tanner et al., 2015; Tanner & Evans, 2014). La técnica RT-LAMP ha demostrado una alta sensibilidad analítica, con límites de hasta 10 copias de ARN viral, mostrando una alta concordancia con RT-PCR en muestras clínicas, lo que respalda su utilidad como alternativa diagnóstica rápida en fase aguda del Dengue (Altın et al., 2025; Ganguli et al., 2020; Hauner et al., 2026).

En ese sentido, el método RT-LAMP ha demostrado ser una técnica altamente sensible para diagnosticar enfermedades infecciosas en humanos y animales, detectando microorganismos en muestras muy pequeñas (Lai et al., 2022; Parida et al., 2008). La capacidad de amplificar ácidos nucleicos con rapidez y sin requerir equipos sofisticados ha permitido que esta técnica se consolide para facilitar la detección de virus, bacterias, hongos y parásitos (Bi et al., 2025; Wong et al., 2018).

La especificidad de LAMP radica en el uso de varios tipos de cebadores: internos (FIP y BIP), externos (F3 y B3) y cebadores de bucle adicionales (LF y LB). Los cebadores externos F3 (*Forward outer primer*) y B3 (*Backward outer primer*) inician la amplificación desplazando las hebras sintetizadas y permiten la formación inicial de la estructura de ADN en forma de mancuerna. Los cebadores internos FIP (*Forward Inner Primer*) y BIP (*Backward Inner Primer*), cada uno compuesto por regiones complementarias (F1c - F2 y B1c - B2, respectivamente), son los principales responsables de la amplificación exponencial, ya que estos reconocen secuencias internas altamente específicas del blanco y dirigen la síntesis continua de ADN. Los cebadores LF (*Loop Forward*) y LB (*Loop Backward*), de uso opcional, se hibridan a las regiones de bucle formadas durante la reacción proporcionando sitios adicionales de inicio de síntesis (Nagamine et al., 2002; Notomi, 2000; Parida et al., 2008; Wong et al., 2018).

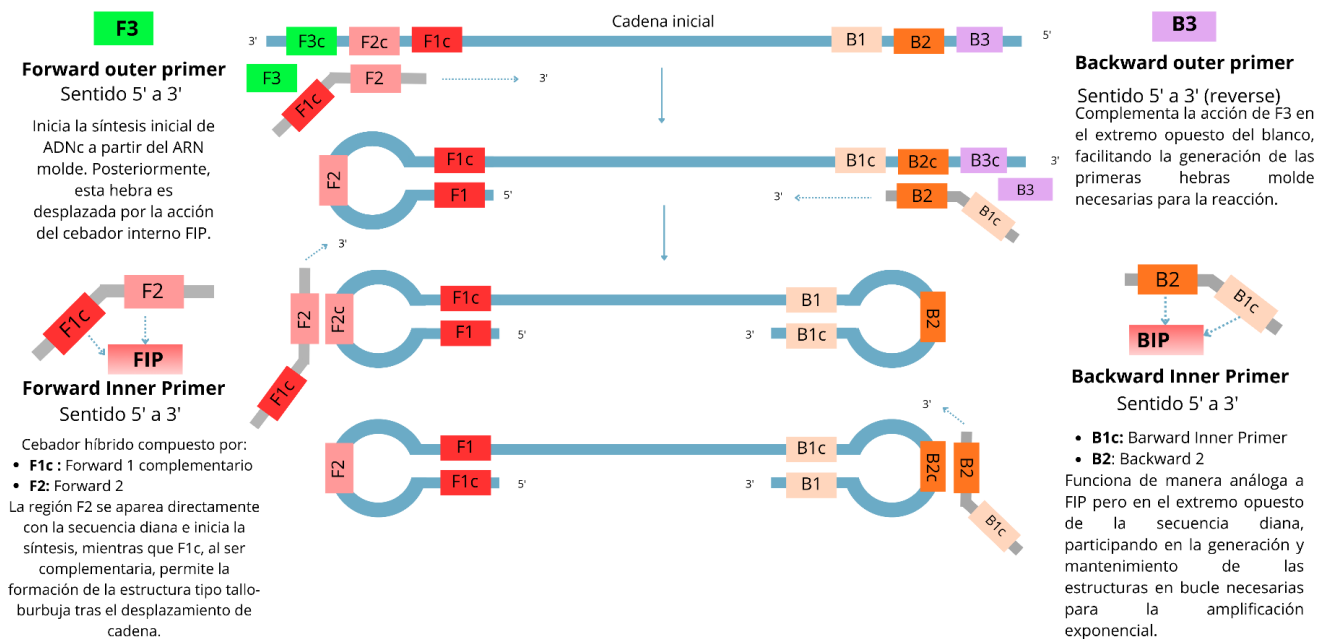
Estos cebadores actúan conjuntamente con una Transcriptasa Reversa termoestable y ADN polimerasa *Bst* con actividad de desplazamiento de cadena lo cual permite sintetizar nuevas cadenas de ADN mientras separa la cadena sin requerir ciclos térmicos, como resultado se tiene una estructura similar a una mancuerna (Figura 2), que sirve como base para la amplificación isotérmica continua (Oscorbin et al., 2022; Oscorbin & Filipenko, 2023; Wong et al., 2018; Yang et al., 2024). La adición de cebadores de bucle (LF y LB) aumenta el número de puntos de inicio de reacción a ocho, lo que aumenta la eficiencia y la sensibilidad del método, además de reducir a la mitad el tiempo de análisis, a la vez que proporciona una mayor precisión y selectividad (Soroka et al., 2021).

Figura 2.

Esquema del funcionamiento de la técnica LAMP.

Mecanismo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). La figura muestra la disposición de los cebadores F3 y B3 (cebadores externos) y FIP y BIP (Cebadores internos), así como sus regiones constitutivas F2, F1c, B2 y B1c, dentro de la secuencia blanco. Los cebadores externos F3 y B3 se unen a las regiones F3 y B3 de la cadena diana respectivamente e inician la síntesis de ADN en las etapas iniciales de la reacción. Su función principal es desplazar las cadenas recién sintetizadas por la acción de la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, facilitando la formación de las estructuras iniciales de amplificación.

A su vez, los cebadores internos FIP y BIP son los responsables del proceso principal de amplificación. EL cebador FIP está compuesto por las secuencias F1c y F2, mientras que BIP contiene las regiones B1c y B2. Estos cebadores se hibridan a sus regiones complementarias y permiten la síntesis de ADN que da lugar a las estructuras en forma de bucle que actúan como molde para la amplificación isotérmica continua. Este funcionamiento coordinado permite la creación de múltiples estructuras autocebadas que permiten ciclos sucesivos de amplificación a temperatura constante (60-65°C). La disposición de los cebadores incrementa la sensibilidad, especificidad y rapidez de LAMP (Nagamine et al., 2002; Notomi, 2000; Wong et al., 2018).



Nota. Esquema del mecanismo de amplificación RT-LAMP y función de los cebadores

F3, B3, FIP y BIP. Elaboración propia basada en Notomi, (2000) y Wong et al. (2018).

La eficacia diagnóstica de RT-LAMP es dependiente de un diseño cuidadoso de sus cebadores dirigidos hacia regiones altamente conservadas del genoma viral (Ptitsyn et al., 2024; Wong et al., 2018) un aspecto relevante en Colombia y la región norandina, en donde, se ha documentado una alta diversidad genética del virus y la circulación simultánea de múltiples linajes de los cuatro serotipos (Hill et al., 2024; Yung et al., 2015). Además de esto, estudios de vigilancia genómica han demostrado que los serotipos que circulan en Colombia, Venezuela y Ecuador presentan una alta proporción de sitios polimórficos a lo largo del genoma viral lo cual evidencia una heterogeneidad marca entre los aislamientos circulantes (Rozas et al., 2017). Esta variabilidad es un factor que incrementa el riesgo de fallas diagnósticas y resultados falsos negativos cuando los cebadores no son compatibles con las variantes predominantes (Kline et al., 2022; Zhou et al., 2019). Adicionalmente, la circulación en simultáneo con arbovirus como Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla refuerza la necesidad de métodos moleculares altamente específicos capaces de discriminar entre infecciones similares (Rico-Mendoza et al., 2019). En este contexto, evaluar la aplicabilidad de la técnica RT-LAMP mediante un análisis *in silico* es imprescindible para garantizar la compatibilidad de los cebadores propuestos con la diversidad genética regional y posicionar este método como una herramienta diagnóstica sensible y específica que se adapte al escenario actual del dengue.

Considerando estos aspectos, la presente pasantía de investigación, vinculada al proyecto “Identificación del Virus del Dengue mediante RT-LAMP y horno de microondas doméstico: Una estrategia para su identificación molecular, accesible y de fácil implementación en laboratorio clínico” tiene como objetivo, el análisis *in silico* de la reacción RT-LAMP con el fin de evaluar su aplicabilidad en la identificación genómica de los 4 serotipos del Virus del Dengue (DENV-1 a DENV-4) en función de las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Analizar *in silico* la reacción RT-LAMP para la identificación genómica de los serotipos del Virus del Dengue en función de bases de datos públicas.

1.2 Objetivos Específicos

Generar una base de datos de las secuencias genómicas de los cuatro serotipos del Virus del Dengue reportadas en GenBank para Colombia y Suramérica.

Diseño *in silico* de oligonucleótidos para la reacción RT-LAMP para serotipos del Virus del Dengue

Validar *in silico* la eficiencia de identificación de los oligonucleótidos RT-LAMP para genomas de serotipos del Virus del Dengue reportados en bases de datos públicas.

2. Competencias

2.1 Cognitivas

1. Desarrolla habilidades cognitivas para búsqueda y análisis de secuencias genómicas del Virus del Dengue en bases de datos públicas.
2. Organiza secuencias genómicas de los serotipos del Virus del Dengue en formato fasta para generar alineamientos múltiples.
3. Diseña oligonucleótidos para serotipos del Virus del Dengue en RT-LAMP.

2.2 Actitudinales

1. Valida *in silico* diseños de oligonucleótidos de RT-LAMP en bases de datos públicas para la identificación de serotipos del Virus del Dengue
2. Colabora en un equipo científico de forma ética y responsable para la implementación y validación *in silico* de sistemas de identificación viral.
3. Elabora estrategias de divulgación escrita y social de información científica para la comunidad.

3. Métodos

Este trabajo se desarrolló con un enfoque *in silico*, orientado al diseño de los cebadores óptimos para la identificación de DENV en secuencias reportadas para los cuatro serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en la base de datos pública del GenBank (Sayers et al., 2022, 2025). El proceso metodológico se dividió en 5 etapas, descritas a continuación:

3.1 Obtención y selección de secuencias:

Se realizó una búsqueda avanzada en la base de datos del GenBank del NCBI (Sayers et al., 2022, 2025), con el fin de obtener las secuencias genómicas completas de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) aisladas en los países de Sudamérica. Para lograr una recuperación precisa de los datos, la estrategia de búsqueda combinó filtros de exclusión por país, tipo de genoma y serotipo viral para garantizar la especificidad de la obtención de la información. La forma general de la cadena de búsqueda fue:

“Dengue virus type (# de serotipo) [Organism] OR Dengue virus (# de serotipo) [Organism] OR DENV(# de serotipo) [Organism] OR Orthoflavivirus denguei [Organism]) AND (complete genome [Title] OR complete cds [Title]) AND (País) NOT (Dengue virus type 2[Organism] OR Dengue virus 2[Organism] OR DENV-2[Organism] OR Dengue virus type 3[Organism] OR Dengue virus 3[Organism] OR DENV-3[Organism] OR Dengue virus type 4[Organism] OR Dengue virus 4[Organism] OR DENV-4[Organism])”

Donde los campos subrayados y en negrilla fueron reemplazados con el serotipo de estudio y el país analizado. Esta búsqueda se realizó para Suramérica cuatro veces por país, una por cada serotipo, y los resultados obtenidos fueron descargados en formato FASTA y se consolidaron para los análisis posteriores.

3.1.1 Filtrado:

Los archivos obtenidos con las secuencias se analizaron mediante Dengue Filter, un código desarrollado por el Semillero de Computación en Biología, Física y Matemática Aplicada (COBIFMAP) y el grupo de investigación en Cómputo Avanzado y A Gran Escala (CAGE). Este código fue implementado principalmente en R, con módulos complementarios en Python. Los análisis en R emplearon librerías especializadas para manejo, análisis y depuración de datos genéticos, mientras que en los análisis en Python se implementó la librería Biopython (módulo SeqIO, para el filtrado y manipulación de las secuencias en formato FASTA (Cock et al., 2009; R Core Team, 2021). Las versiones de R, Python y las librerías empleadas se encuentran documentadas en el repositorio del proyecto (enlace al repositorio: <https://github.com/GenomicUIS/DENV>). Este código fue diseñado para identificar y excluir automáticamente las secuencias con presencia de nucleótidos indeterminados o gaps, con el fin de evitar comprometer los análisis posteriores de alineación y diseño. Adicionalmente, se incorporaron criterios de depuración complementarios para garantizar la calidad de los datos, incluyendo aceptar solo secuencias entre los 10.2 y 10.8 kb para obtener secuencias completas. Así mismo se limitó la proporción de nucleótidos ambiguos a menor o igual al 1%, también se incluyó el eliminar secuencias duplicadas y priorizar entradas de *RefSeq* ya que tienen un proceso de curación más riguroso. Como resultado se obtuvieron los archivos FASTA con las secuencias con mayor calidad, para maximizar la homogeneidad del conjunto para la posterior obtención de secuencias consenso.

3.2 Alineamientos y obtención de secuencias consenso

3.2.1 Alineamientos

Los archivos con las secuencias genómicas previamente filtradas se procesaron utilizando la herramienta MAFFT versión 7 (Katoh & Standley, 2013), que realiza alineamientos múltiples y emplea la transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform*, FFT) para acelerar la detección de similitudes sin comprometer la calidad del alineamiento (Katoh, 2002). Los parámetros utilizados fueron los más estrictos recomendados por el programa, con penalización de apertura de gaps = 5.00 y offset = 1.0, según se sugiere en el manual de MAFFT los cuales, permitieron controlar el nivel de alineamiento local evitando sobreajuste en regiones con divergencias menores (Katoh & Standley, 2013).

Se realizaron cuatro alineamientos por país, uno por cada archivo de secuencias por serotipo. Los resultados del alineamiento se visualizaron con la herramienta de proyección de MAFFT para identificar secuencias divergentes que se encontraban marcadamente alejadas del patrón del conjunto. Estas secuencias se evaluaron individualmente usando BLAST 2.16.0+ (Altschul et al., 1990), para confirmar su correspondencia con el serotipo analizado en el momento considerando el porcentaje de similitud con otras secuencias reportadas y publicadas en el GenBank, así como las secuencias de referencia para DENV-1 (KM204119), DENV-2 (KM204118), DENV-3 (KU050695), DENV-4 (KR011349) (Sayers et al., 2022). Las secuencias no correspondientes fueron descartadas para obtener una mayor coherencia y calidad en los alineamientos, en concordancia con la clasificación taxonómica actual de DENV, la cual permite optimizar la selección de secuencias relevantes para el estudio (Hill et al., 2024).

A partir de los alineamientos generados para cada serotipo de DENV, se cuantificó la variabilidad genética intra-serotipo se cuantificó utilizando DnaSP v6 (Rozas et al., 2017),

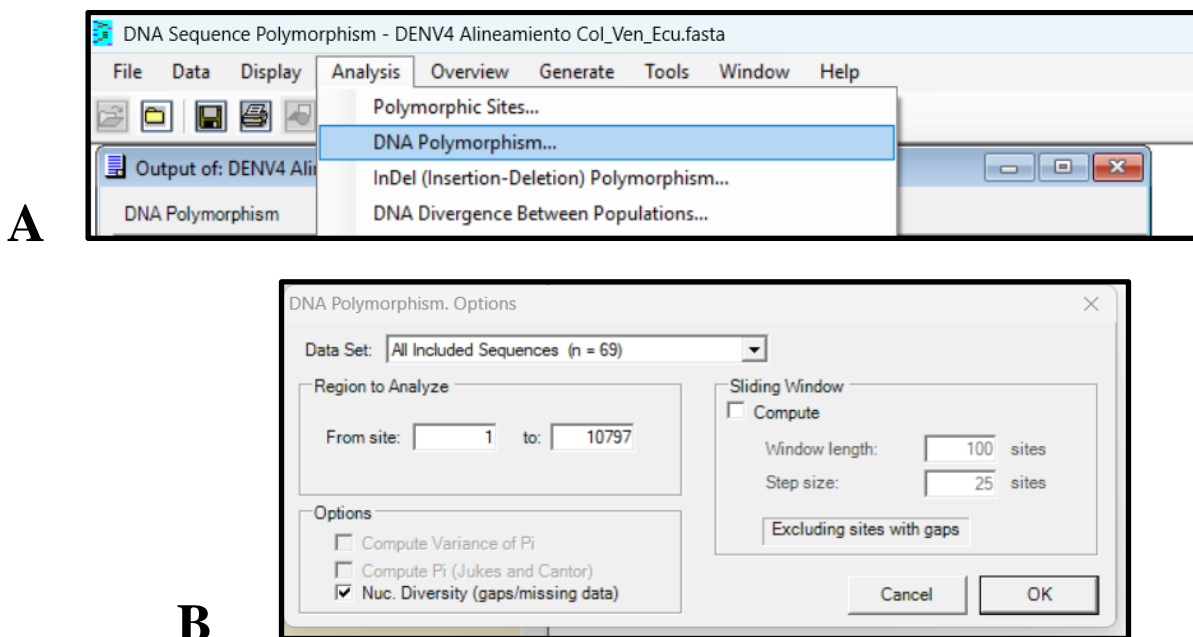
mediante la opción *Analysis > DNA Polymorphism*, considerando únicamente posiciones informativas y excluyendo gaps y datos faltantes. Se calcularon el número de sitios polimórficos (S) y el número total de posiciones válidas (L), y se estimó el porcentaje de variabilidad genética como: $\% \text{ variabilidad} = (S/L) \times 100$, a fin de comparar la diversidad genética intra-serotipo entre las regiones geográficas estudiadas.

Figura 3.

Cálculo de porcentaje de variabilidad en los alineamientos

- A. Selección de la opción *DNA Polymorphism* en el software DnaSP para el análisis de la variabilidad genética a partir de alineamientos múltiples en formato FASTA
- B. Configuración del análisis, donde se definió la región genómica evaluada y los parámetros empleados, incluyendo la exclusión de sitios con gaps o datos faltantes, con el fin de estimar la proporción de sitios polimórficos en los alineamientos

Fuente: Software DnaSP (Rozas et al., 2017).



3.2.2 *Consensos*

Para obtener los consensos generales de cada serotipo se utilizó BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), para cada país se generaron 2 tipos de consensos por serotipo, el primer estricto, con un 100% de coincidencia que conserva todas las variaciones genéticas teniendo en cuenta el código IUPAC y el segundo un consenso mayoritario que representa las bases más frecuentes por posición. Dado el alto nivel de variabilidad observado en Suramérica y para priorizar la especificidad de los cebadores, se trabajó con las secuencias reportadas para Colombia, Venezuela y Ecuador; países que, por su proximidad y dinámica de movilidad humana y de vectores, comparten flujos virales similares (Maljkovic Berry et al., 2020).

Los seis consensos (tres mayoritarios y tres estrictos) obtenidos para cada serotipo se alinearon nuevamente en MAFFT y el alineamiento obtenido fue procesado con BioEdit para obtener dos tipos de consensos un consenso mayoritario estricto (100% de coincidencia, IUPAC) y un consenso mayoritario general (con 20 % de similitud). Estos consensos se superpusieron para comparar variaciones y documentar las diferencias en un archivo de Microsoft Word. Este enfoque se apoya en los modelos de evolución molecular que incorporan eventos de inserción y delección, así como procesos de pérdida de ADN, los cuales explican la distribución no uniforme de la variabilidad genómica a lo largo de las secuencias alineadas y aportan un marco teórico para interpretar las diferencias observadas entre los consensos (Arndt, 2007; Cadena-Caballero et al., 2023; Messer et al., 2005).

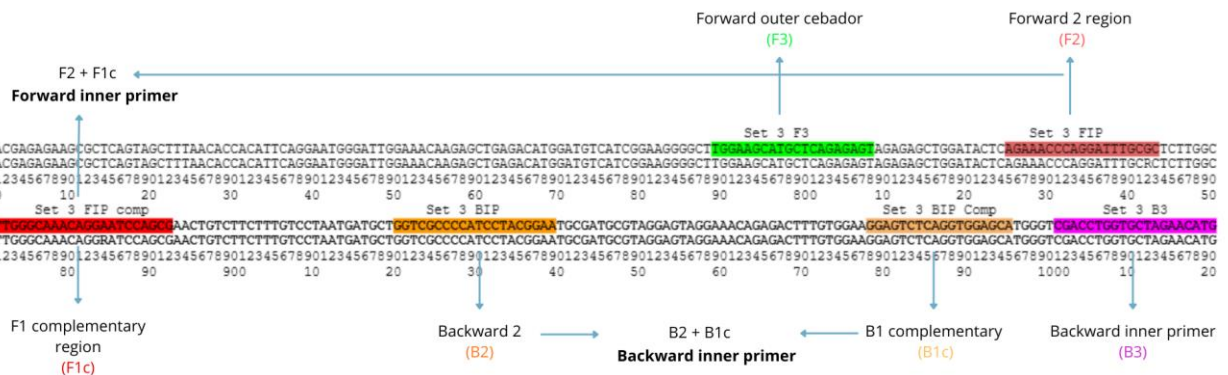
3.3 Obtención de cebadores

Los cebadores necesarios para RT-LAMP fueron diseñados por medio de *NEB® LAMP Primer Design Tool* (New England Biolabs, 2024, <https://lamp.neb.com/#/>) (Colosimo et al., 2025), empleando la estructura mínima del método, conformada por cuatro cebadores esenciales específicos *Forward outer primer* (F3), *Backward outer primer* (B3), *Forward inner primer* (FIP) y *Backward inner primer* (BIP) a partir de una secuencia blanco, ingresada en formato FASTA. Aunque la técnica para el diseño de RT-LAMP permite la incorporación de cebadores de bucle *Loop Forward* (LF) y *Loop Backward* (LB) para acelerar la reacción, estos no se obtuvieron de manera consistente en los sets diseñados por lo que, para garantizar la homogeneidad metodológica y permitir una comparación equitativa entre serotipos, en análisis se restringe a los cebadores básicos, los cuales, son suficientes para la amplificación isotérmica.

Para la obtención de los cebadores se usó el consenso mayoritario de cada serotipo, seleccionando 1500 pares de bases (pb) para cada análisis. Los sets de cebadores encontrados se localizaron manualmente en el alineamiento por serotipo (estricto y mayoritario) para visualizar cada set de cebadores en la secuencia consenso del serotipo respectivo. Para maximizar el número de sets, se aplicó una ventana deslizante de 1500 pb, posicionada inmediatamente después del último cebador del set previo, teniendo en cuenta el marco abierto de lectura viral. En este proceso se incluyó el diseño de los cebadores para el control positivo *RNAsa P*. Cada set de cebadores se distribuyó de la siguiente manera, en donde los cebadores fueron representados con los siguientes colores:

Figura 4.

Organización y distribución de los cebadores F3, B3, FIP, BIP y sus regiones internas F2, F1c, B2, B1c dentro de la secuencia blanco para la reacción RT- LAMP. Los cebadores externos facilitan el desplazamiento de cadenas, mientras que los cebadores internos permiten la formación de las estructuras en bucle que actúan como molde para la amplificación continua. Resaltado en verde se encuentra el cebador F3, mientras que F2 y el F1c que forman el primer FIP se encuentran en tonos rojos. El cebador BIP conformado por B2 y B1c se encuentran resaltados con tonos naranjas y por último B3 se encuentra en tono rosado.



Fuente: Elaboración de la autora.

Los cebadores B3 (*Backward outer cebador*), F1c (*Forward inner complementary*) y B1c (*Backward inner complementary*) al ser cebadores complementarios y diseñados en antisentido a la cadena consenso, se reescribieron en dirección sentido lo que permitió su identificación y visualización en orientación 5' a 3' dentro de la secuencia del consenso mayoritario.

3.4 Selección y análisis de cebadores:

Para la selección de los cebadores se revisó cada set diseñado, dando preferencia los que se encontraron en regiones altamente conservadas dentro de la secuencia consenso, de este modo, los sets seleccionados se analizaron con BLASTn del NCBI (Altschul et al., 1990), verificando su similitud frente a secuencias de GenBank correspondientes al serotipo evaluado para tener un set representativo por serotipo. Este análisis se realizó como un ejercicio de validación teórica de uno de los sets diseñados, con el propósito de estimar su potencial desempeño diagnóstico, compatibilidad genómica y exclusividad frente a otros arbovirus en bases de datos públicas.

Posteriormente, se realizó una validación funcional *in silico*. Para cada serotipo se tomó (1) una secuencia representativa aleatoria de la región de interés y (2) una secuencia sin restricción geográfica, con el fin de contrastar la correlación con secuencias reportadas a nivel global. Este procedimiento permitió verificar los sitios de inicio y la posibilidad de amplificación por RT-LAMP para los sets seleccionados en Colombia, Venezuela y Ecuador.

Para verificar la exclusividad de los sets frente a DENV y descartar su reactividad frente a otros arbovirus se seleccionaron secuencias de Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla aleatoriamente. Posteriormente, se evaluó la compatibilidad *in silico* de los cebadores con dichas secuencias, para descartar iniciación de RT-LAMP no específica (falsos positivos).

Los cebadores seleccionados fueron evaluados mediante OligoAnalyzer™ (IDT Technologies) para determinar sus propiedades fisicoquímicas al calcular el porcentaje de GC (Guanina - Citosina), temperatura de melting (T_m) y energía libre asociada (ΔG), parámetros esenciales para validar la estabilidad y funcionalidad de los cebadores (Owczarzy et al., 2008).

4. Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo del estudio, estos fueron organizados según las etapas descritas en la metodología, en donde, se incluyen los datos obtenidos durante el proceso de recopilación, limpieza, alineamiento y análisis de secuencias. Así como el diseño de los cebadores RT-LAMP para los serotipos de DENV y su validación *in silico*.

4.1 Obtención y Selección de Secuencias

La búsqueda avanzada de las secuencias genómicas completas de DENV (DENV-1 a DENV-4) compiló un total de 1.159 secuencias genómicas provenientes de 11 países de Sudamérica, a su vez se incluyeron las secuencias encontradas para Panamá debido a su cercanía con la zona de estudio (Apéndice A). La distribución de estas secuencias por país y por serotipo se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1.

Secuencias genómicas completas del Virus del Dengue obtenidas del GenBank por país y serotipo

Secuencias genómicas obtenidas de la base de datos del GenBank					
País	Serotipo				Total secuencias por país
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
Colombia	48	212	88	10	358
Bolivia	2	0	1	1	4
Brasil	18	0	1	37	56
Paraguay	6	2	14	63	85
Perú	35	60	54	0	149
Panamá	2	1	1	0	4
Venezuela	117	112	135	63	427
Chile	1	0	0	0	1
Ecuador	9	27	2	2	40
Uruguay	1	0	0	0	1

Secuencias genómicas obtenidas de la base de datos del GenBank					
País	Serotipo				Total secuencias por país
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
Argentina	33	1	0	0	34
Total secuencias					1159

Tras aplicar filtros de calidad con el script “Dengue Filter” generado por el grupo CAGE y el semillero COBIFMAP el cual elimina secuencias con nucleótidos indeterminados, gaps, ambigüedades IUPAC o información faltante, se conservaron 846 secuencias (Tabla 2; Apéndice B). Mediante un segundo filtro por alineamiento y BLAST, las secuencias obtenidas fueron verificadas, se validó la asignación serotípica utilizando la herramienta BLAST para confirmar que las secuencias correspondiesen al serotipo en el que se encontraban agrupadas. Así mismo se excluyeron *outliers* por conflicto taxonómico (Figura 5). El conjunto final fue de 794 secuencias (Apéndice C).

Tabla 2.

Total de secuencias de los serotipos del Virus del Dengue conservadas por país y serotipo después de aplicar filtros de calidad y verificación por alineamiento.

Secuencias genómicas obtenidas de la base de datos del GenBank Filtradas					
País	Serotipo				Total secuencias por país
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
Colombia	24	60	25	9	118
Bolivia	1	0	1	0	2
Brasil	15	0	1	34	50
Paraguay	6	2	14	60	82
Perú	23	51	50	0	124
Panamá	2	1	1	0	4
Venezuela	111	96	135	59	401
Chile	1	0	0	0	1
Ecuador	6	18	2	2	28
Uruguay	1	0	0	0	1
Argentina	34	1	0	0	35

Total secuencias

846

Finalmente, las secuencias obtenidas fueron verificadas mediante el proceso de alineamiento múltiple con MAFFT. Se identificaron conflictos en algunas secuencias que a pesar de los filtros anteriores presentaban una alta divergencia con el grupo general. Estas secuencias fueron validadas mediante BLAST para confirmar su asignación con respecto al serotipo y aquellas que no presentaban coincidencia con el serotipo correspondiente se excluyeron del análisis por conflicto taxonómico (Figura 6). El número final de secuencias validada tras el segundo filtro fue de 794. Las secuencias por serotipo obtenidas por cada país se presentan en la Tabla 3. En donde se resumen los filtros realizados y el recuento de las secuencias conservadas.

Figura 5.

Se muestra un ejemplo de cómo con BLAST se identifica una secuencia de DENV-2, que se encuentra más relacionada con DENV-1.

BLAST® » blastn suite » results for RID-C1U6UF7Z014

Home Recent Results Saved Strategies Help

ase is now the default Protein BLAST database. [Learn more about ClusteredNR](#)

[< Edit Search](#) Save Search Search Summary ▾

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title: Nucleotide Sequence

RID: C1U6UF7Z014 Search expires on 09-11 10:56 am [Download All](#) ▾

Program: BLASTN [Citation](#) ▾

Database: core_nt [See details](#) ▾

Query ID: lcl|Query_507415

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 10711

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ [?](#)

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus isolate DENVEN-CC0032_complete genome	Dengue virus	19780	19780	100%	0.0	100.00%	10711	MH450306.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus_1 strain VE_61084_2007_complete genome	dengue virus typ...	19394	19394	100%	0.0	99.39%	10735	HQ332179.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus_1 isolate DENV-1/VE/BID-V2229/2004_complete genome	dengue virus typ...	19381	19381	100%	0.0	99.44%	10676	FJ639796.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus_1 strain VE_61059_2006_complete genome	dengue virus typ...	19372	19372	100%	0.0	99.35%	10735	HQ332177.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus_1 isolate DENV-1/VE/BID-V2235/2004_complete genome	dengue virus typ...	19365	19365	100%	0.0	99.36%	10691	FJ639802.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus_1 isolate DENV-1/VE/BID-V2264/2006_complete genome	dengue virus typ...	19354	19354	100%	0.0	99.35%	10691	FJ639824.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dengue virus_1 isolate DENV-1/VE/BID-V2227/2004_complete genome	dengue virus typ...	19354	19354	100%	0.0	99.39%	10676	FJ639794.1

Las secuencias por serotipo obtenidas por cada país se presentan en la Tabla 3, en donde, se resumen los filtros realizados y el recuento de las secuencias conservadas.

Tabla 3.

Total de secuencias conservadas por país después de los dos filtros de depuración por calidad y verificación por alineamiento

Secuencias obtenidas por serotipo después de los dos filtros				
País	Serotipo	Secuencias del primer filtro	Secuencias retiradas por conflicto	Total secuencias
Colombia	DENV-1	24	0	24
	DENV-2	60	26	34
	DENV-3	25	0	25
	DENV-4	9	0	9
Bolivia	DENV-1	1	0	1
	DENV-2	0	0	0
	DENV-3	1	0	1
	DENV-4	0	0	0
Brasil	DENV-1	15	0	15
	DENV-2	0	0	0
	DENV-3	1	0	1
	DENV-4	34	0	34
Paraguay	DENV-1	6	0	6
	DENV-2	2	0	2
	DENV-3	14	0	14
	DENV-4	60	0	60
Perú	DENV-1	23	0	23
	DENV-2	51	0	51
	DENV-3	50	0	50
	DENV-4	0	0	0
Panamá	DENV-1	2	0	2
	DENV-2	1	0	1
	DENV-3	1	0	1
	DENV-4	0	0	0
Venezuela	DENV-1	111	0	111
	DENV-2	96	0	96
	DENV-3	135	13	122
	DENV-4	59	13	46
Chile	DENV-1	1	0	1
	DENV-2	0	0	0
	DENV-3	0	0	0
	DENV-4	0	0	0
Ecuador	DENV-1	6	0	6
	DENV-2	18	0	18
	DENV-3	2	0	2
	DENV-4	2	0	2
Uruguay	DENV-1	1	0	1
	DENV-2	0	0	0
	DENV-3	0	0	0
	DENV-4	0	0	0

Argentina	DENV-1	34	0	34
	DENV-2	1	0	1
	DENV-3	0	0	0
	DENV-4	0	0	0
Total secuencias obtenidas				794

4.1.1 Alineamientos

Se generaron 23 alineamientos correspondientes a cada serotipo (DENV-1 - DENV-4) en los 11 países analizados (Apéndice D). Los alineamientos fueron analizados por medio de DNaSP para calcular su porcentaje de variabilidad entre secuencias del mismo país. En cuanto a las secuencias de DENV-1 la variabilidad se evidencia más en Argentina con aproximadamente un 9,64% de variabilidad mientras que Brasil, Colombia y Venezuela presentaron porcentajes de 8.45, 8.35, 15.85% respectivamente, los países con menor variabilidad en este serotipo fueron Ecuador y Paraguay con porcentaje de (3-3.4%), los resultados obtenidos con las secuencias de DENV-1 reportadas en Panamá y Chile no se consideran debido al bajo muestreo. Para DENV-2 se presentó variabilidad mayor, especialmente para las secuencias reportadas en Venezuela con un 23.52% de variabilidad, Colombia y Perú fueron los siguientes con un porcentaje del 20.53 y 19.52% respectivamente. DENV-3 muestra mayor variabilidad en las secuencias reportadas en Venezuela con 34.39% de variabilidad y DENV-4 mostró valores más bajos de variabilidad con alineamientos mayormente conservados en Brasil, Paraguay y Colombia (Tabla 4).

Teniendo en cuenta estos resultados se realizó un alineamiento general por serotipo y posteriormente se repitió el análisis del porcentaje de variabilidad genética entre secuencias (Tabla 4) que mostró un mejor agrupamiento entre las secuencias reportadas para Colombia, Venezuela y Ecuador en comparación al conjunto de secuencias total de Suramérica sugiriendo circulación entre el virus en estos países lo cual también está evidenciado en los alineamientos posteriores. El análisis de variabilidad genética en DnaSP (Tabla 4) mostró menor variabilidad en el subconjunto Colombia-Venezuela-Ecuador frente al conjunto sudamericano, lo que podría reflejar patrones de

circulación compartida. Sin embargo, factores como la variabilidad estimada pueden verse influenciados por el tamaño de la muestra por país como en el caso de Panamá con DENV-1 que podrían reflejar un número limitado de secuencias disponibles, más que una mayor diversidad genética real.

Tabla 4.

Comparación del porcentaje de variabilidad entre los alineamientos obtenidos de Suramérica con respecto a los de Colombia, Venezuela y Ecuador.

País	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
Argentina	9,64%	N/A	N/A	N/A
Brasil	8,45%	N/A	N/A	2,63%
Colombia	8,35%	20,53%	7,54%	4,53%
Ecuador	3,32%	1,53%	0,25%	1%
Panamá	31,31%	N/A	N/A	N/A
Paraguay	3,37%	0,27%	3,87%	3,21%
Perú	6,59%	19,52%	3,92%	N/A
Venezuela	15,85%	23,52%	34,39%	7,61%

Figura 6.

Se presenta, a manera de ejemplo, el alineamiento correspondiente a una región altamente variable del gen C/prM del serotipo 2 del virus del dengue, con el fin de evidenciar los patrones de diversidad

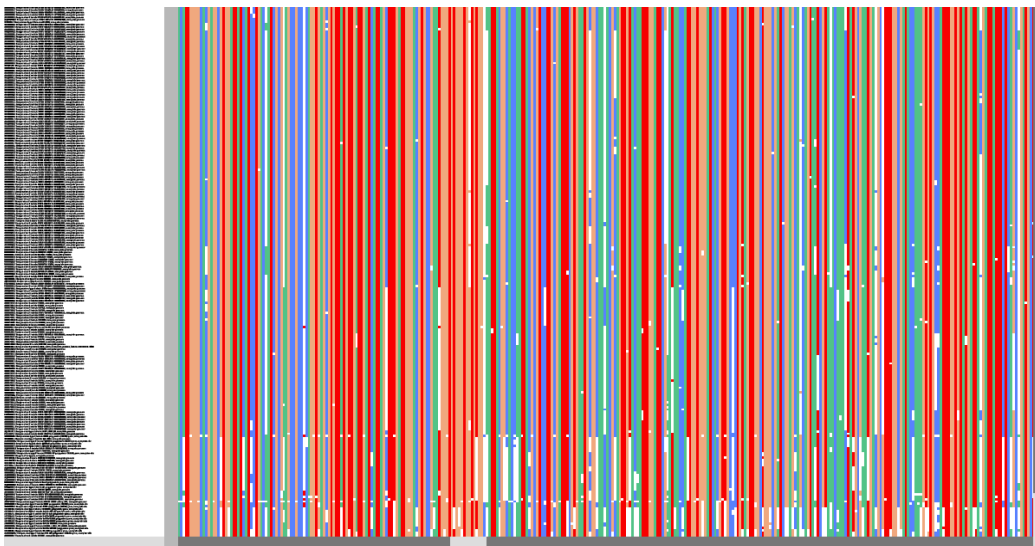
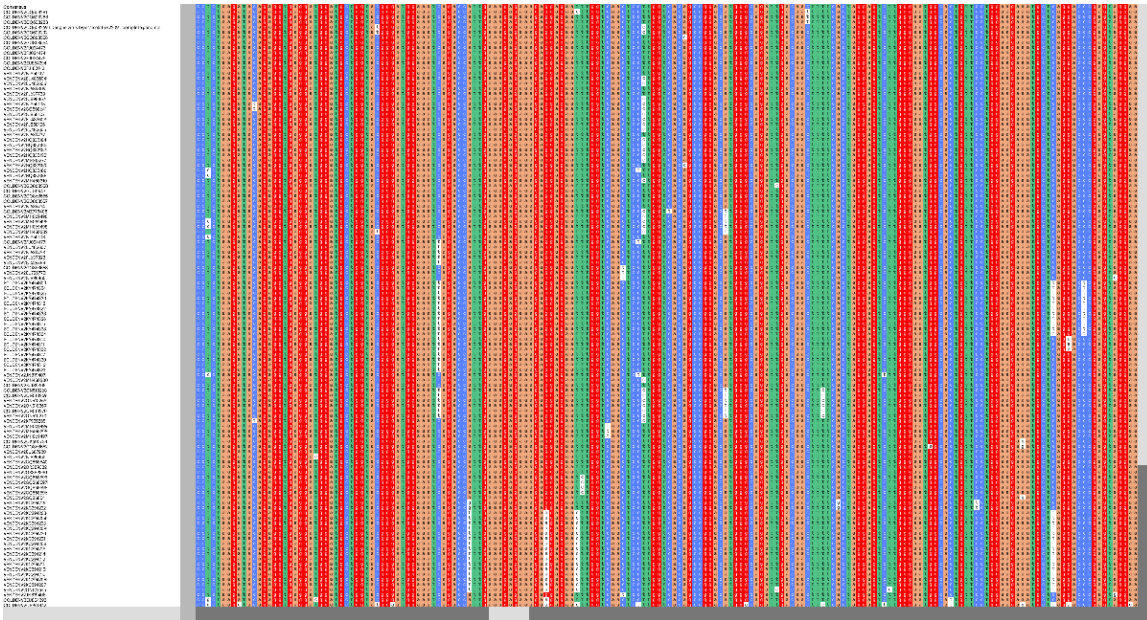


Figura 7.

Alineamiento de secuencias de Colombia, Ecuador y Venezuela correspondientes al serotipo DENV-2 en la región del gen C/prM, en el cual se observa una mayor homogeneidad entre las secuencias y la presencia de regiones conservadas, potencialmente relevantes para el diseño de cebadores

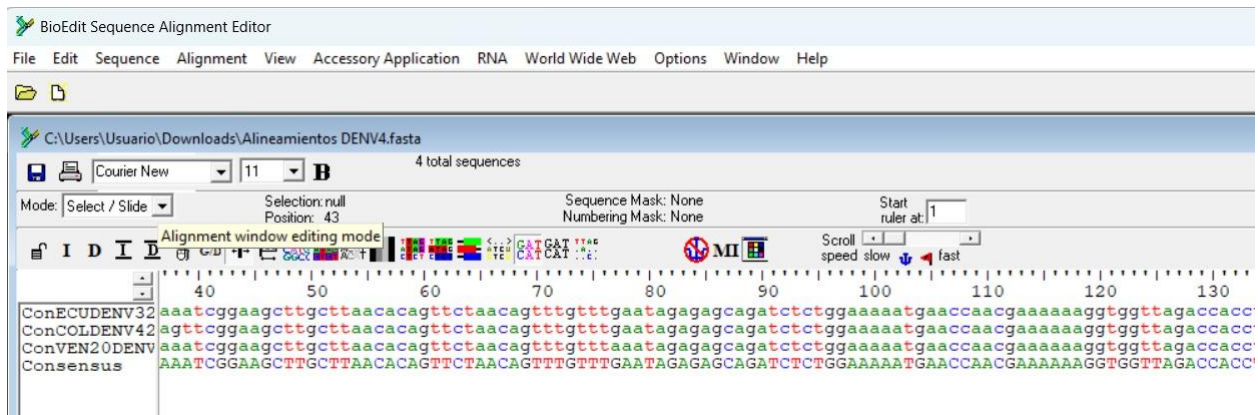
**4.1.2 Consensos**

Del análisis entre países se obtuvieron un total de 24 secuencias consenso correspondientes a los serotipos DENV-1 a DENV-4 registrados en Colombia, Venezuela y Ecuador. Por cada país y serotipo se generaron dos consensos (uno mayoritario y uno estricto) para representar tanto la variabilidad de la secuencia genómica como las secuencias altamente conservadas.

Posteriormente, se generaron dos consensos generales por serotipo, uno estricto obtenido usando parámetro de 100% en BioEdit y otro mayoritario (parámetro 20%). Con esto se produjeron en total 12 consensos finales: 1 mayoritario y 1 estricto por serotipo (Apéndice E)

Figura 8.

Generación de consensos a partir de los alineamientos obtenidos para DENV-4 en la herramienta BioEdit. Este procedimiento se replicó para cada serotipo.

**4.2 Obtención de Cebadores**

A partir de las secuencias consenso finales se obtuvieron un total de 112 sets (Apéndice F) de cebadores diseñados para los 4 serotipos de DENV distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 5.

Sets de cebadores RT-LAMP diseñados para los serotipos del Virus del Dengue en relación con el número de segmentos de 1.500 pb utilizados para su diseño

Serotipo	Total de sets obtenidos	Número de segmentos utilizados
DENV-1	23	7
DENV-2	32	7
DENV-3	32	8
DENV-4	25	10

Nota. La tabla contiene la información completa de los 112 sets de cebadores diseñados incluyendo las secuencias de cada iniciador.

Cada set corresponde a un juego mínimo de cebadores de RT-LAMP el cual está compuesto por 4 cebadores esenciales (F3, B3, FIP y BIP), localizados en las regiones conservadas de los consensos mayoritarios. El análisis realizado mostró que las regiones blanco de los cebadores están distribuidas en distintos genes tanto estructurales como no estructurales dependiendo del serotipo (Tabla 6, A).

4.2.1 Selección y Análisis de Cebadores

Se seleccionó un set representativo de los cebadores por serotipo considerando criterios de conservación de la región en donde se generó el cebador al observar menor variabilidad entre el consenso mayoritario y el estricto y su compatibilidad mediante BLAST a las secuencias reportadas en el GenBank. Los sets seleccionados fueron aquellos que presentaron cebadores localizados en regiones altamente conservadas del consenso mayoritario general por cada serotipo, las regiones conservadas se identificaron principalmente en genes variables, tanto estructurales (Estructural E), como no estructurales (NS1, NS3, NS5). Siendo los cebadores para cada serotipo:

Para las siguientes figuras los nucleótidos resaltados en:

La caja verde resalta el Oligonucleótido en dirección sentido (5' - 3') para la RT- PCR de punto final y la amplificación sentido de la reacción de LAMP (F3).

La caja rosada resalta el Oligonucleótido en dirección sentido (5' - 3') para la amplificación en sentido de la reacción LAMP (F2).

La caja azul resalta el Oligonucleótido en dirección sentido (5' - 3') que corresponde a la región complementaria para la generación de la estructura tallo burbuja para la amplificación LAMP (F1c).

La caja naranja resalta el Oligonucleótido en dirección sentido (5' - 3') para la amplificación de la reacción tipo LAMP y corresponde al sitio de inicio de la síntesis de DNA para la amplificación Lamp (B2).

La caja amarilla resalta el Oligonucleótido en dirección sentido (5' - 3') que corresponde a la región complementaria para la generación de la estructura tallo burbuja para la amplificación LAMP (B1c).

La caja púrpura resalta el Oligonucleótido en dirección antisentido (3' - 5') para la RT- PCR de punto final y la amplificación sentido de la reacción de LAMP (B3).

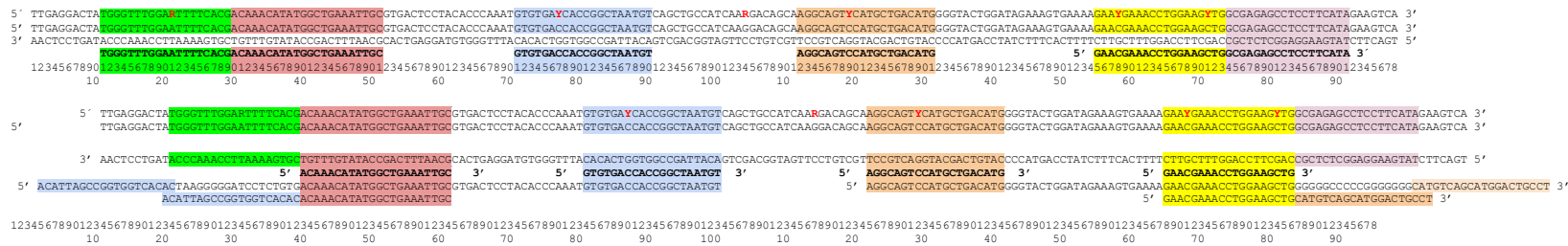
Los nucleótidos indicados con los colores se especifican en el inciso anterior. El nombre de los oligonucleótidos propuestos por el software NEB LAMP PRIMER DESIGN TOOL

(<https://lamp.neb.com/#/>)

Figura 9.

Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-1, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción. La figura A representa la predicción de la estructura secundaria de los cebadores realizada con mfold, la cual muestra confirmaciones con la mínima energía libre mientras que la figura B representa la visualización tridimensional aproximada de la conformación estructural de la formación tallo-burbuja.

Región del 2854 al 3034 (181 pb) gen NS1 de la secuencia consenso del DENV- 1, generada con 24 genomas de Colombia 6 de Ecuador y 95 de Venezuela y localización de cebadores para la amplificación tipo RT-PCR y LAMP de la región de la secuencia consenso del serotipo DENV-1:



Secuencia completa y formato Viena de la formación de las estructuras tallo burbuja generadas por los primers F3, F2 y B2, B1c:

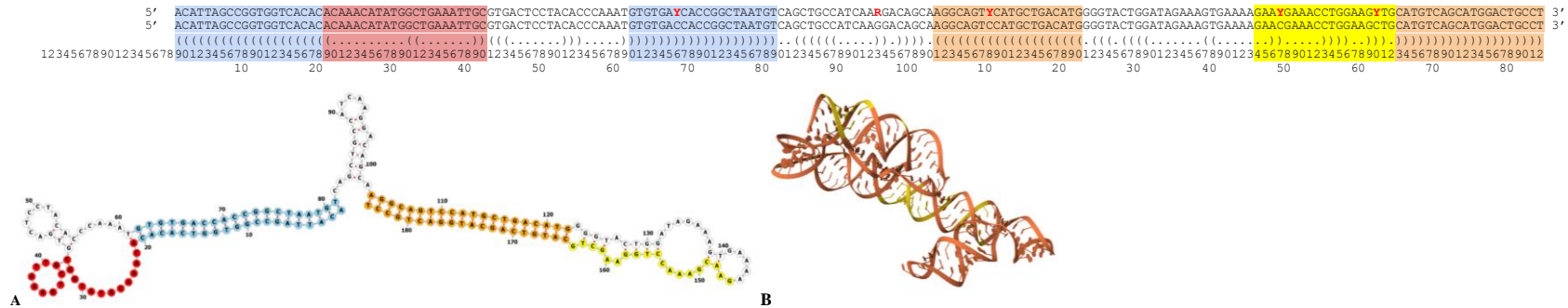
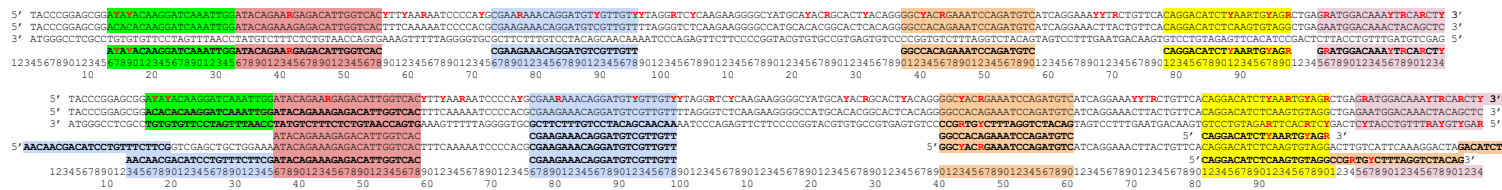


Figura 10.

Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-2, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción. La figura A representa la predicción de la estructura secundaria de los cebadores realizada con mfold, la cual muestra confirmaciones con la mínima energía libre mientras que la figura B representa la visualización tridimensional aproximada de la conformación estructural de la formación tallo- burbuja.

Región del 1601 al 1809 (209 pb) de la secuencia consenso del DENV-2, generada con 59 genomas de Colombia 19 de Ecuador y 59 de Venezuela y localización de cebadores para la amplificación tipo RT-PCR y LAMP de la región de la secuencia consenso del serotipo DENV-2:



Secuencia completa y formato Viena de la formación de las estructuras tallo burbuja generadas por los primers F3, F2 y B2, B1c

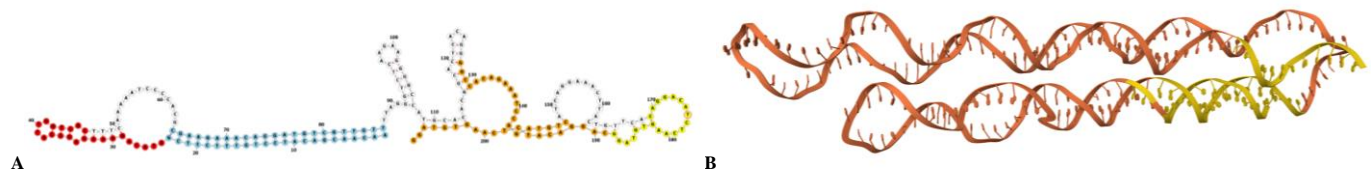
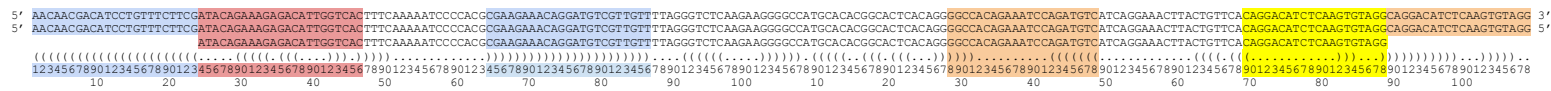
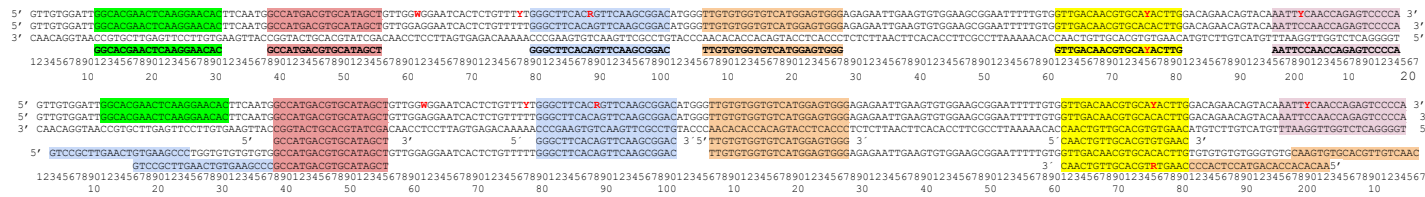


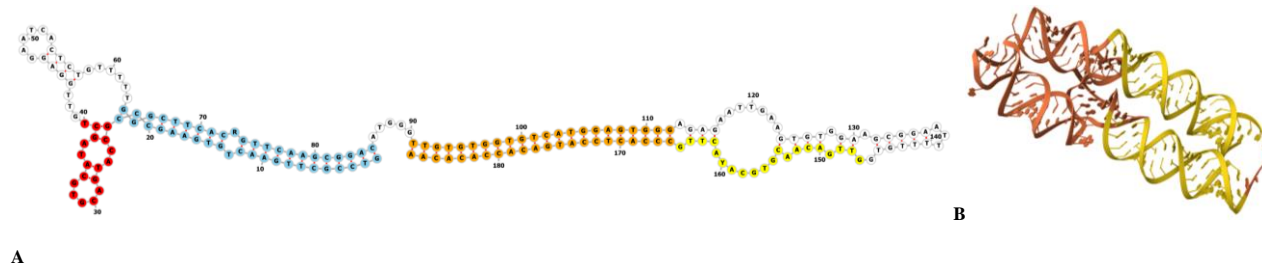
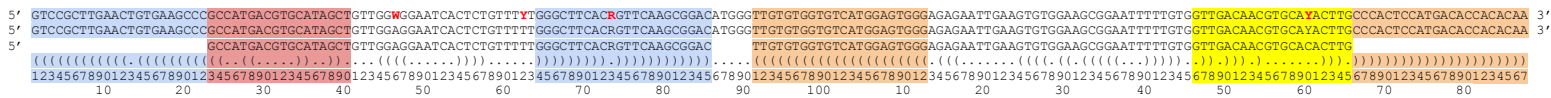
Figura 12.

Estructura secundaria y terciaria de la región objetivo del genoma del DENV-4, con los sitios de hibridación de los cebadores RT-LAMP y la secuencia blanco de reacción. La figura A representa la predicción de la estructura secundaria de los cebadores realizada con mfold, la cual muestra confirmaciones con la mínima energía libre mientras que la figura B representa la visualización tridimensional aproximada de la conformación estructural de la formación tallo- burbuja.

Región del 2307 al 2476 Proteína de membrana E DENV-4, generada con 9 genomas de Colombia 2 de Ecuador y 58 de Venezuela y localización de cebadores para la amplificación tipo RT-PCR y LAMP de la región de la secuencia consenso del serotipo DENV-4:



Secuencia completa y formato Viena de la formación de las estructuras tallo burbuja generadas por los primers F3, F2 y B2, B1c



4.3 Validación *in silico* de los cebadores Seleccionados:

Los sets de cebadores escogidos mostraron una alta coincidencia con respecto a las 2 secuencias aleatorias correspondientes a su serotipo, y la relación con respecto a otros arbovirus se presenta en la sección B de la Tabla 6.

Tabla 6

Las tablas A y B resumen la validación in silico de los sets básicos diseñados para RT-LAMP (F3, B3, FIP y BIP) en términos de especificidad y exclusividad. La tabla 6A presenta la coincidencia total acumulada de nucleótidos del set frente a secuencias genómicas de referencia para el respectivo serotipo de DENV. En la Tabla B se muestra el análisis de los cebadores frente a otros arbovirus (Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla) donde se observaron coincidencias parciales, pero no amplificación funcional.

A

Serotipo	# Coincidencia de nucleótidos/ total del cebador	Región que codifica	Secuencias Referenciadas GenBank	Nombre de la Secuencia
DENV-1	118/118	NS1	GQ868570.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/CO/BID-V3391/2008, complete genome
	117/118	NS1	PP626438.1	Dengue virus type 1 isolate AR876890 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1 lncRNA gene, partial sequence
DENV-2	127/127	Estructural E	FJ182012.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/CO/BID-V1597/2005, complete genome
	125/127	Estructural E	PQ527038.1	Dengue virus type 2 isolate DENV-2/USA/FL-BPHL-0113/2024 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA1

				lncRNA gene, partial sequence
DENV-3	121/121	NS5	GU131954.1	Dengue virus 3 isolate DENV- 3/CO/BID- V3404/2006, complete genome
	117/121	NS5	PQ553470.1	Dengue virus type 3 isolate CUBA_LIB2022_b arcode21_D3-181 polyprotein (POLY) gene, partial cds
DENV-4	120/123	NS3, NS1, Estructural E	FJ024476.1	Dengue virus 4 isolate DENV- 4/CO/BID- V1600/1997, complete genome
	120/123	NS3, NS1, Estructural E	PQ617118.1	Dengue virus type 4 isolate DENV- 4/USA/FL-BPHL- 0137/2024 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and sRNA2 lncRNA gene, partial sequence

B.

Serotipo	# Coincidencia de nucleótidos/ total del cebador	Región que codifica	Secuencias Referenciadas GenBank	Nombre de la Secuencia
DENV-1	61/118	prM/M, NS4B, NS3, NS5	LC571077.1	Synthetic Zika virus MR/PR(E) gene for polyprotein, complete cds
	63/118	nsP2, nsP1, nsP3, E2	PX236189.1	Chikungunya virus isolate GDFS2025X12, complete genome
	66/118	NS3, NS4B, NS5	PV710591.1	Yellow fever virus isolate UWARN_YFVHUM LPA_002_25FA polyprotein gene, complete cds

DENV-2	62/127	NS5, NS3, NS4B, Estructural E	LC571077.1	Synthetic Zika virus MR/PR(E) gene for polyprotein, complete cds
	78/127	E1, nsP1, nsP2, C, 6K/TF	PX236189.1	Chikungunya virus isolate GDFS2025X12, complete genome
	66/127	NS3, NS4B, NS5	PV710591.1	Yellow fever virus isolate UWARN_YFVHUM LPA_002_25FA polyprotein gene, complete cds
DENV-3	67/121	NS5	PQ553470.1	Synthetic Zika virus MR/PR(E) gene for polyprotein, complete cds
	64/121	nsP3, nsP1, C, nsP4	PX236189.1	Chikungunya virus isolate GDFS2025X12, complete genome
	67/121	NS2B, NS5, NS3, nsP1, C	PV710591.1	Yellow fever virus isolate UWARN_YFVHUM LPA_002_25FA polyprotein gene, complete cds
DENV-4	63/123	NS3, NS1, Estructural E	FJ024476.1	Synthetic Zika virus MR/PR(E) gene for polyprotein, complete cds
	54/123	nsP3, nsP2, nsP1	PX236189.1	Chikungunya virus isolate GDFS2025X12, complete genome
	57/123	nsP1, nsP3, nsP2	PV710591.1	Yellow fever virus isolate UWARN_YFVHUM LPA_002_25FA polyprotein gene, complete cds

Nota. La comparación de los cebadores con respecto a las secuencias de referencia se profundiza en el Apéndice G. Esta tabla representa el resumen de la validación *in silico* de los cebadores seleccionados para cada serotipo mostrando la coincidencia de nucleótidos por set de cebadores y su presencia positiva para la hibridación en donde las secuencias LC571077.1, PX236189.1 y PV710591.1 representan secuencias de Zika, Chikunguña y fiebre amarilla respectivamente y las 2 cebadoras secuencias son secuencias de DENV correspondientes al serotipo evaluado.

A continuación, se muestran un resumen de los resultados de la evaluación fisicoquímica de cada cebador mediante *OligoAnalyzer*:

Tabla 7.

Análisis fisicoquímico de los cebadores de RT-LAMP mediante oligoanalyzer

Cebador	%GcContent	Tm (°C)	ΔG estructura secundaria (kcal/mol)
F3_DV1LAPCR	44,7	59,7	0,41
FIP_DV1LAMP	44	74,3	-2,98
B3_DV1LAPCR	55,6	60,4	-0,31
BIP_DV1LAMP	51,3	74,2	-4,96
F3_DV2LAPCR	35	56,1	-0,8
FIP_DV2LAMP	41,3	73,1	-4,33
B3_DV2LAPCR	42,5	58,9	2,5
BIP_DV2LAMP	50	73,7	-1,94
F3_DV3LAPCR	52,6	62,4	-0,57
FIP_DV3LAMP	53,6	76,7	-5,85
B3_DV3LAPCR	50	62,9	-1,04
BIP_DV3LAMP	58,8	77,6	-3,24
F3_DV4LAPCR	55	63,1	0,11
FIP_DV4LAMP	57,5	77,8	-3,41
B3_DV4LAPCR	47,5	62,4	0,14
BIP_DV4LAMP	51,2	76	-5,83

Nota: El valor reportado corresponde a la energía libre asociada a la formación de estructuras secundarias intramoleculares (*hairpins*) o dímeros del cebador, calculado mediante la herramienta *OligoAnalyzer* bajo condiciones estándar de reacción. En términos termodinámicos, un valor de ΔG más negativo refleja una mayor estabilidad estructural, lo que podría favorecer la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares del cebador y, por lo tanto, se disminuye su capacidad de unión a su región complementaria para que se realice la polimerización.

5. Discusión de Resultados

El desarrollo y validación *in silico* de cebadores para la técnica de RT-LAMP representa un avance significativo en el diagnóstico molecular del DENV, los resultados obtenidos demuestran no sólo la viabilidad técnica del diseño, sino también su potencial aplicación en escenarios reales de salud pública, particularmente en regiones endémicas como Colombia y la región norandina de Suramérica (Arkell et al., 2023; Hurtado-Gómez et al., 2025).

La fase inicial de curación de datos genómicos fue fundamental para garantizar la confiabilidad del estudio, ya que, se parte de un conjunto inicial de 1,159 secuencias completas obtenidas de GenBank, por lo cual, se implementó un código de filtrado de dos etapas que refleja buenas prácticas en bioinformática; un filtro de calidad, basado en la identificación y eliminación de secuencias con nucleótidos ambiguos ('N') o gaps, permitió depurar la base de datos en un 27%, resultando en 846 secuencias de alta fidelidad, siendo un paso crítico, ya que las secuencias de baja calidad pueden introducir errores en los alineamientos y afectar la especificidad de los cebadores (Jiang et al., 2020). Este enfoque es consistente con estudios realizados para otros flavivirus como Zika en donde se realizó un filtrado equivalente con secuencias de este virus para eliminar entradas con ambigüedades y anotaciones incorrectas y así disminuir el sesgo bioinformático en los alineamientos (Theys et al., 2017). En cuanto a DENV, Yenamandra et al., (2021), resaltó la importancia de eliminar las secuencias erróneas o incongruentes para evitar sesgos en los estudios evolutivos de DENV-2 (Yenamandra et al., 2021). Así mismo se realizó segundo filtro, de carácter taxonómico mediante alineamiento múltiple y verificación con BLAST, que eliminó secuencias incongruentes o mal clasificadas (26 secuencias de DENV-2 en Colombia), consolidando un conjunto final de 794 secuencias genómicas validadas, verificando mediante este

proceso que los consensos generados estén basados en datos de la más alta calidad, minimizando el ruido bioinformático y el riesgo de diseñar cebadores sobre artefactos de secuenciación o variantes erróneas.

Así mismo, el análisis de los alineamientos múltiples evidenció una elevada heterogeneidad genética entre los aislamientos de diferentes países, sin embargo, se identificó una mayor homogeneidad de secuencias entre los países que conforman el corredor norandino, es decir, Colombia, Venezuela y Ecuador. Este comportamiento ha sido reportado en estudios de epidemiología genómica de DENV, donde se evidencia una dinámica de transmisión regional con múltiples introducciones y flujo viral entre estos países, favoreciendo la circulación de linajes relacionados y, por ende, una mayor similitud genética entre ellos (Rivero et al., 2026). Este patrón fue respaldado por el análisis del porcentaje de variabilidad genética realizado mediante DnaSP, en el cual se observó una reducción en la variabilidad al considerar únicamente las secuencias de Colombia, Venezuela y Ecuador en comparación con el conjunto de Suramérica. No obstante, estos resultados corresponden a un análisis descriptivo y, por lo tanto, podrían ser complementados en futuros estudios con análisis estadísticos inferenciales que permitan evaluar la significancia de las diferencias observadas. En particular los serotipos DENV-1 y DENV-2 mostraron una reducción significativa, lo que es compatible con una mayor homogeneidad genética y podría reflejar patrones de circulación compartida, aun así, en estos resultados están ligados a factores de cantidad de muestras por país y posibles sesgos asociados a las secuencias reportadas y disponibles en el GenBank. A su vez, este comportamiento antes mencionado es consistente con estudios que han empleado herramientas similares para evaluar diversidad genética. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Lambrechts et al. (2012) en Tailandia en el que se observó una baja variabilidad en los clados locales de DENV-1, mientras que, Onoja et al. (2023) en África

evidenció una reducción similar en DENV-2 (Lambrechts et al., 2012; Onoja et al., 2023). En cuanto a DENV-3 y DENV-4 conservaron sus niveles de variabilidad sugiriendo múltiples introducciones virales que coinciden con los estudios realizados por Costa et al. (2012) y Villabona-Arenas et al. (2014) quienes documentaron diferentes introducciones virales y de coexistencia de linajes en estos serotipos para América Latina (Costa et al., 2012; Villabona-Arenas et al., 2014). Estos hallazgos son coherentes con los flujos epidemiológicos y migratorios documentados en la región, donde se ha descrito un intercambio constante de linajes de DENV entre Colombia, Venezuela y Ecuador (Rivero et al., 2026). Esto permitió justificar estratégicamente la selección de secuencias de estos tres países para la generación de los consensos mayoritarios y estrictos, puesto que este enfoque geográficamente dirigido aumenta la probabilidad de que los cebadores sean efectivos contra las variantes virales que circulan local y regionalmente, un principio que ha sido respaldado por estudios similares en el diseño de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 (Miranda et al., 2024).

Del mismo modo, con la herramienta NEB® LAMP Primer Design Tool aplicada sobre los consensos mayoritarios se obtuvieron 112 juegos con el mínimo reglamentario de cebadores. Si bien la incorporación de cebadores de bucle (LF y LB) puede incrementar la amplificación en ensayos RT-LAMP, su ausencia no compromete la especificidad ni la viabilidad del método, esto debido a que la amplificación isotérmica puede llevarse a cabo eficazmente con el set mínimo de cebadores (F3, B3, FIP y FIP) (Nagamine et al., 2002; Notomi, 2000).

La distribución desigual por serotipo y en particular, la necesidad de evaluar más segmentos genómicos ($n = 10$) en DENV-4, sugiere mayor diversidad o menor frecuencia de regiones altamente conservadas en este serotipo, lo que plantea desafíos adicionales para el diseño

diagnóstico y es consistente con observaciones filodinámicas previas que han documentado su elevada diversidad y múltiples introducciones en la región (Villabona-Arenas et al., 2014).

La selección del set representativo para cada serotipo se fundamentó en su localización dentro de las regiones más conservadas del consenso, donde la validación *in silico* de estos sets mediante BLASTn contra secuencias de referencia de diversas regiones geográficas arrojó porcentajes de identidad altos, con coincidencias que oscilaron entre 96.7% y 100% (Lopez-Jimena et al., 2018). Así mismo, las discrepancias menores observadas fueron abordadas mediante la incorporación estratégica de nucleótidos degenerados en las secuencias finales de los cebadores, siendo esta, una estrategia ampliamente utilizada en el diseño de cebadores para patógenos altamente variables, puesto que permite que un único cebador pueda hibridar eficientemente con las pequeñas variantes naturales del virus, maximizando así la sensibilidad y la capacidad de detección sin comprometer la especificidad (Miranda et al., 2024).

Por su parte, el análisis de especificidad cruzada confirmó que los cebadores seleccionados y su coincidencia parcial contra los genomas de otros arbovirus relevantes como Zika, Chikunguña y Fiebre Amarilla no implica amplificación funcional, esto debido a que la iniciación de la reacción de RT-LAMP depende críticamente de la complementariedad correcta en los extremos 3' de los cebadores y de no ser así, estos desajuste reducen la eficiencia de extensión por la polimerasa incluso si hay complementariedad parcial en otras posiciones del cebador (Bru et al., 2008; Lefever et al., 2013). Esta especificidad es un pilar fundamental para evitar diagnósticos falso-positivos en entornos donde estos virus coexisten de forma endemo-epidémica. Estudios de validación clínica de RT-LAMP para SARS-CoV-2 han enfatizado la importancia de este paso, reportando especificidades superiores al 98.8% cuando se incluyen controles de patógenos cercanos filogenéticamente (Escalante-Maldonado et al., 2021; Jiang et al., 2020).

Un aspecto destacado de este trabajo fue la evaluación implícita de la robustez termodinámica de los cebadores. No obstante, estudios recientes destacan que la presencia de desajustes (*mismatches*) entre el cebador y el genoma viral, particularmente aquellos causados por mutaciones, pueden afectar la temperatura de hibridación y comprometer la eficiencia de la amplificación (Escalante-Maldonado et al., 2021). En RT-LAMP, los valores óptimos de temperatura de fusión (T_m) se han establecido en rangos aproximados de 55 a 65 °C para los cebadores externos (F3 y B3) y entre 60 a 74 °C para los cebadores internos (FIP y BIP), parámetros que han sido confirmados y refinados en estudios recientes manteniendo coherencia con los principios descritos originalmente para esta técnica (Becherer et al., 2020; Lynch et al., 2025). Los valores de T_m obtenidos en este estudio para las secuencias representativas se encuentran mayoritariamente dentro de los rangos óptimos reportados, lo que indica una adecuada afinidad de los cebadores para mantener la hibridación incluso frente a la variabilidad genética entre serotipos. En cuanto al contenido de guanina-citosina (G:C), se recomienda un rango entre el 40 % y el 60 % para garantizar un equilibrio adecuado entre estabilidad y especificidad de los cebadores (Becherer et al., 2020; Lynch et al., 2025). En este estudio, los valores obtenidos oscilaron entre 45 % y 57 %, lo cual evidencia condiciones favorables de estabilidad que promueven la adecuada unión de los cebadores a la secuencia blanco y la eficiencia del proceso de amplificación. En cuanto a la energía libre (ΔG), se obtuvieron valores comprendidos entre -0.31 a -4.96 kcal/mol, correspondientes al ΔG mínimo asociado a la formación de estructuras secundarias intramoleculares tipo *hairpin*, calculado mediante *OligoAnalyzer* bajo condiciones estándar. Estos valores indican una baja estabilidad de estas estructuras lo que reduce la probabilidad de interferencia con la amplificación. En el contexto de RT-LAMP indican baja probabilidad de formar dímeros y ΔG de -2 a -5 kcal/mol son aceptados para cebadores largos y

no se asocian con una inhibición significativa de la amplificación, lo cual indica una baja probabilidad de interacciones secundarias estables (Mori & Notomi, 2009; Nagamine et al., 2002; Notomi, 2000; Tomita et al., 2008).

En relación a lo anterior, es importante considerar que en la técnica RT-LAMP, debido al diseño molecular requerido para los cebadores FIP y BIP, es común registrar valores moderadamente negativos de ΔG . En este contexto, se consideran aceptables valores de ΔG superiores a -9.0 kcal/mol para dímeros y horquillas, umbral utilizado como referencia en el diseño de ensayos isotérmicos (Tullayaprayouch et al., 2025). Por lo tanto, los cebadores aquí evaluados presentan niveles de estructura secundaria dentro de los márgenes tolerables, lo que minimiza el riesgo de interferencia significativa con la eficiencia de la reacción RT-LAMP.

El hecho de que los cebadores representativos seleccionados mantuvieran alta identidad frente a la variabilidad natural sugiere estabilidad termodinámica suficiente para tolerar pequeños desajustes sin perder funcionalidad, aspecto especialmente relevante para DENV-2 y DENV-4, que mostraron mayor heterogeneidad (Miranda et al., 2024; Zhou et al., 2019).

Además, el análisis estructural mostró que las regiones conservadas permiten la formación de estructuras del tipo "tallo-burbuja", las cuales son características del mecanismo de amplificación de la técnica RT-LAMP. Estas predicciones no garantizan el diseño experimental, pero son consistentes con las características estructurales descritas para ensayos RT-LAMP funcionales que son fundamentales para una amplificación eficaz apoyando la plausibilidad del diseño propuesto (Mori & Notomi, 2009; Notomi, 2000). La ADN polimerasa *Bst* que será empleado en RT-LAMP, es reconocida por su habilidad de desplazar hebras y soportar inhibidores habituales en muestras biológicas, esto le otorga una mayor robustez para ser usada con muestras

clínicas complejas, igualmente, la estabilidad termodinámica que se observa en las estructuras predichas indica que los cebadores tienen una alta especificidad de unión, lo cual minimiza la creación de dímeros o estructuras secundarias no deseadas (Escalante-Maldonado et al., 2021).

Este estudio presenta limitaciones debido a su enfoque exclusivamente *in silico*. En primer lugar, la representatividad de las estimaciones de cobertura y especificidad están sujetas a las secuencias disponibles en bases de datos públicas como el GenBank, las cuales pueden estar afectadas por sesgos en el muestreo geográfico, temporal y de calidad, lo que influye tanto en la diversidad observada como en el uso de nucleótidos degenerados en los consensos generados (Grubaugh et al., 2018). A su vez las predicciones *in silico* no consideran factores propios de la validación *in vitro*, como presencia de inhibidores, la variabilidad de las matrices clínicas, la eficiencia de la extracción de ARN y las condiciones experimentales, los cuales pueden afectar el desempeño real de los cebadores y deben ser evaluados mediante ensayos experimentales controlados (Notomi, 2000; Wong et al., 2018). Finalmente, la evolución genética continua de DENV representa un riesgo potencial para la pérdida progresiva de funcionalidad de los sets de cebadores diseñados, particularmente en serotipos con mayor diversidad genética como DENV-4. Este aspecto resalta la necesidad de una actualización continua periódica de los diseños diagnósticos basada en vigilancia genómica continua, tal como ha sido documentado en estudios filodinámicos previos (Grubaugh et al., 2018; Villabona-Arenas et al., 2014).

Si bien los resultados *in silico* predicen un alto desempeño, su valor debe confirmarse experimentalmente. Estudios de RT-LAMP han demostrado que el método puede alcanzar sensibilidades clínicas entre el 78.9% y el 97%, y especificidades del 100% cuando se compara con RT-qPCR, incluso trabajando directamente con muestras de saliva sin extracción de ARN, en ese sentido, la implementación de un ensayo RT-LAMP para dengue en Colombia podría

descentralizar el diagnóstico, puesto que al requerir sólo un baño de agua o bloque termostático podría llevarse a cabo en laboratorios de mediana complejidad o incluso en puntos médicos de atención, además la lectura colorimétrica en tubo cerrado representa una ventaja al disminuir el riesgo de contaminación por aerosoles, lo cual es un aspecto a tener en cuenta en la implementación de ensayos basados en LAMP (Taki et al., 2021). Estos factores permitirán de esta manera reducir costos y tiempos, dado que el protocolo RT-LAMP puede completarse en menor tiempo, frente al tiempo de una RT-qPCR, y fortalecer la vigilancia epidemiológica mediante un monitoreo en tiempo real de serotipos circulantes.

6. Conclusiones

El estudio *in silico* permitió recopilar y depurar un conjunto robusto de secuencias genómicas de DENV en Suramérica. Inicialmente se obtuvieron 1.159 secuencias completas de GenBank, de las cuales, tras un filtrado por calidad y una verificación taxonómica, se conservaron 794 de alta confiabilidad. Este proceso excluyó entradas con nucleótidos ambiguos o incongruencias taxonómicas y fortaleció la precisión de los consensos.

Los alineamientos evidenciaron una alta variabilidad genética entre países, sin embargo, se identificó una mayor coherencia en las secuencias de Colombia, Venezuela y Ecuador, lo que justificó su uso como base principal del análisis y refleja los flujos epidemiológicos y la circulación viral en la región andina, probablemente facilitados por la movilidad poblacional y la distribución de vectores.

A partir de los consensos obtenidos, se diseñaron 112 sets de cebadores RT-LAMP, distribuidos entre los cuatro serotipos, posteriormente, se seleccionó un set representativo por cada

serotipo, priorizando regiones genómicas altamente conservadas. Esta estrategia equilibra sensibilidad y especificidad, elementos cruciales para el diagnóstico molecular.

El análisis estructural y funcional de los cebadores mostró que las regiones seleccionadas permiten la formación adecuada de las estructuras tipo tallo-burbuja, esenciales para la eficiencia del método LAMP. Además, las validaciones *in silico* con BLAST confirmaron la exclusividad de los cebadores frente a los serotipos de dengue, descartando reactividad cruzada con otros arbovirus como Zika, Chikunguña y Fiebre Amarilla, siendo un resultado particularmente relevante para evitar falsos positivos en zonas endémicas donde co-circulan múltiples arbovirus.

En conjunto, estos resultados respaldan que el diseño *in silico* de cebadores RT-LAMP es una estrategia viable para desarrollar herramientas de diagnóstico molecular del dengue adaptadas a la diversidad genética regional. No obstante, el desempeño real del ensayo debe confirmarse mediante validación experimental y clínica (límite de detección, robustez en matrices clínicas, reproducibilidad y potencial reactividad cruzada bajo condiciones de laboratorio), como paso necesario para su eventual implementación en Colombia y países vecinos.

En relación con los objetivos planteados, la pasantía de investigación cumplió el objetivo general de analizar *in silico* la reacción RT-LAMP para la identificación genómica de los serotipos de DENV a partir de bases de datos públicas. Se logró generar una base de datos depurada de secuencias completas de DENV para Suramérica. Mediante el diseño *in silico* de cebadores serotipo específicos y la validación su eficiencia, evaluación estructural, fisicoquímica y de especificidad de identificación por medio de herramientas bioinformáticas, se alcanzaron los objetivos específicos de la presente pasantía confirmando con un ejemplo la viabilidad de los cebadores propuestos en compatibilidad con la diversidad genética del Dengue circulante en la región.

Desde el punto de vista formativo, este trabajo permitió el desarrollo de competencias cognitivas en la búsqueda, organización y análisis de secuencias genómicas, así como, en el diseño y validación *in silico* de cebadores. Además, se desarrollaron competencias actitudinales relacionadas con el trabajo colaborativo, análisis crítico de resultados y la comunicación de la información científica.

7. Recomendaciones

Se recomienda realizar vigilancia genómica de los datos reportados y disponibles en bases de datos públicas como el GenBank para realizar una actualización periódica de los cebadores diseñados, de esta forma se podrá tener una mayor especificidad con respecto a la variabilidad de los serotipos.

Discriminar y contrastar las nuevas variantes genotípicas de los cuatro serotipos de DENV mediante la nueva clasificación taxonómica para esclarecer posibles linajes de interés clínico para la salud pública.

De igual manera, se recomienda implementar el desarrollo de un prototipo de sistema de diagnóstico basado en RT-LAMP en toda Colombia, para la identificación del Virus del Dengue en entornos de campo, como centros de salud rurales o laboratorios clínicos.

Finalmente se recomienda validar experimentalmente este diseño de set de cebadores para RT-LAMP *in silico* para evaluar su potencial en muestras biológicas contaminadas con dengue.

Referencias Bibliográficas

- Altın, H., Agel, E., & Tosun, A. I. (2025). Rapid and simple detection of HCV RNA: enhanced colorimetric RT-LAMP method using unmodified gold nanoparticles. *BMC Microbiology*, 25(1), 757. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04465-8>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arkell, P., Mairiang, D., Songjaeng, A., Malpartida-Cardenas, K., Hill-Cawthorne, K., Avirutnan, P., Georgiou, P., Holmes, A., & Rodriguez-Manzano, J. (2023). Analytical and diagnostic performance characteristics of reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification assays for dengue virus serotypes 1–4: A scoping review to inform potential use in portable molecular diagnostic devices. *PLOS Global Public Health*, 3(8), e0002169. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0002169>
- Arndt, P. F. (2007). Reconstruction of ancestral nucleotide sequences and estimation of substitution frequencies in a star phylogeny. *Gene*, 390(1–2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.11.022>
- Arruda, V. de O., Filho, L. R. G., & Neves, A. F. (2024). Aptamer-associated colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of dengue virus. *Microbiology Spectrum*, 12(9). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03583-23>
- Avendaño, C., & Patarroyo, M. A. (2020). Loop-Mediated Isothermal Amplification as Point-of-Care Diagnosis for Neglected Parasitic Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7981. <https://doi.org/10.3390/ijms21217981>

- Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R., & von Stetten, F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods*, *12*(6), 717–746. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
- Bi, Q., Liu, M., Yan, L., Cheng, J., Sun, Q., Dai, Y., & Zou, L. (2025). Progress in the application of isothermal amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Frontiers in Microbiology*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1601644>
- Brogi, S., Ramalho, T. C., Kuca, K., Medina-Franco, J. L., & Valko, M. (2020). In silico Methods for Drug Design and Discovery. *Frontiers in Chemistry*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00612>
- Bru, D., Martin-Laurent, F., & Philippot, L. (2008). Quantification of the Detrimental Effect of a Single Primer-Template Mismatch by Real-Time PCR Using the 16S rRNA Gene as an Example. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(5), 1660–1663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
- Cadena-Caballero, C. E., Munive-Argüelles, N., Vera-Cala, L. M., Barrios-Hernandez, C., Duarte-Bernal, R. O., Ayus-Ortiz, V. L., Pardo-Díaz, L. A., Agudelo-Rodríguez, M., Bautista-Rozo, L. X., Jimenez-Gutierrez, L. R., & Martinez-Perez, F. (2023). APGW/AKH Precursor from Rotifer *Brachionus plicatilis* and the DNA Loss Model Explain Evolutionary Trends of the Neuropeptide LWamide, APGWamide, RPCH, AKH, ACP, CRZ, and GnRH Families. *Journal of Molecular Evolution*, *91*(6), 882–896. <https://doi.org/10.1007/s00239-023-10146-9>
- Calvo, E. P., Madroñero, L. J., Hernández, L. M., Arturo, J. A., Pinzón, H., Delgado, F. G., Velandia-Romero, M. L., Hill, V., Grubaugh, N. D., & Castellanos, J. E. (2026). Unexpected diversification of DENV2 genotype III in Colombia: New Insights and application of the globalized nomenclature. *PLOS One*, *21*(2), e0343528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0343528>
- CDC. (2024). *Areas with risk of dengue*. Centers for Disease Control and Prevention. https://dndi.org/diseases/dengue/facts/?gad_campaignid=17059181031

- Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M. J. L. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422–1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>
- Colosimo, F., Tanner, N. A., & Patton, G. C. (2025). *LAMP Primer Design using the NEB LAMP Primer Design Tool: Critical Considerations for Assay Robustness, Speed and Sensitivity*. https://collaborate.neb.com/m/cc0bbc21ec612a7/original/LAMP_TechNote_0425.pdf
- Costa, R. L., Voloch, C. M., & Schrago, C. G. (2012). Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.011>
- Escalante-Maldonado, O., Vidal-Anzardo, M., Donaires, F., Solis-Sanchez, G., Gallesi, I., Pampa-Espinoza, L., Huaranga, M., Rojas-Serrano, N., García, C., Angles-Yanqui, E., Gavilán, R. G., Durães-Carvalho, R., Mendez-Rico, J., Cabezas, C., & Marques-Simas, P. V. (2021). Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in house para el diagnóstico de SARS-CoV-2. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(1), 7–16. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.7154>
- Ganguli, A., Mostafa, A., Berger, J., Aydin, M. Y., Sun, F., Ramirez, S. A. S. de, Valera, E., Cunningham, B. T., King, W. P., & Bashir, R. (2020). Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(37), 22727–22735. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014739117>
- Grubaugh, N. D., Ladner, J. T., Lemey, P., Pybus, O. G., Rambaut, A., Holmes, E. C., & Andersen, K. G. (2018). Tracking virus outbreaks in the twenty-first century. *Nature Microbiology*, 4(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0296-2>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, 41(1), 95–98.
- Hauner, A., Aroni-Sierra, J., Merino, X., Villa, C., Torres, F., Lagatie, O., Talledo, M., Ariën, K. K., & Falconi-Agapito, F. (2026). Assessing the diagnostic performance of clinical, serological and molecular approaches to improve dengue case detection in the Peruvian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 20(2), e0013984. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0013984>
- Hill, V., Cleemput, S., Pereira, J. S., Gifford, R. J., Fonseca, V., Tegally, H., Brito, A. F., Ribeiro, G., de Souza, V. C., Brcko, I. C., Ribeiro, I. S., De Lima, I. T. T., Slavov, S. N., Sampaio, S. C., Elias, M. C., Tran, V. T., Kien, D. T. H., Huynh, T., Yacoub, S., ... Grubaugh, N. D. (2024). A new lineage nomenclature to aid genomic surveillance of dengue virus. *PLOS Biology*, 22(9), e3002834. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002834>
- Hurtado, L., Díaz, D., Escorcía, K., Flórez, L., Bello, Y., Díaz, Y., Navarro, E., Pacheco, L. C., Galán, N., Maestre, R., Acosta, A., & Pacheco, L. A. (2022). Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2. *Biomédica*, 42(Sp. 2), 59–72. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6523>
- Hurtado-Gómez, L., Escorcía-Lindo, K., Rosero, J. S., Solano Llanos, N., Barrios Sánchez, C., Díaz Pérez, A., Díaz-Olmos, Y., García, J., Bello-Lemus, Y., Pacheco-Londoño, L. C., Acosta Hoyos, A. J., & Pacheco-Lugo, L. A. (2025). Development and Validation of a Combined RT-LAMP Assay for the Rapid and Sensitive Detection of Dengue Virus in Clinical Samples from Colombia. *Diagnostics*, 15(5), 570. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15050570>
- INS. (2024). *Boletín epidemiológico semanal: Dengue*. <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Informesdeevento/DENGUE%20PE%20II%202024.pdf>

- Jiang, M., Pan, W., Arasthfer, A., Fang, W., Ling, L., Fang, H., Daneshnia, F., Yu, J., Liao, W., Pei, H., Li, X., & Lass-Flörl, C. (2020). Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>
- Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kline, E. C., Panpradist, N., Hull, I. T., Wang, Q., Oreskovic, A. K., Han, P. D., Starita, L. M., & Lutz, B. R. (2022). Multiplex Target-Redundant RT-LAMP for Robust Detection of SARS-CoV-2 Using Fluorescent Universal Displacement Probes. *Microbiology Spectrum*, *10*(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01583-21>
- Lai, M. Y., Bukhari, F. D. M., Zulkefli, N. Z., Ismail, I., Mustapa, N. I., Soh, T. S. T., Hassan, A. H., Peariasamy, K. M., Lee, Y. L., Suppiah, J., Thayan, R., Isa, M. K. M., Wahid, N. Z. A., & Lau, Y. L. (2022). Clinical testing on SARS-CoV-2 swab samples using reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *BMC Infectious Diseases*, *22*(1), 697. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07684-w>
- Lambrechts, L., Fansiri, T., Pongsiri, A., Thaisomboonsuk, B., Klungthong, C., Richardson, J. H., Ponlawat, A., Jarman, R. G., & Scott, T. W. (2012). Dengue-1 Virus Clade Replacement in Thailand Associated with Enhanced Mosquito Transmission. *Journal of Virology*, *86*(3), 1853–1861. <https://doi.org/10.1128/JVI.06458-11>

- Lefever, S., Pattyn, F., Hellemans, J., & Vandesompele, J. (2013). Single-Nucleotide Polymorphisms and Other Mismatches Reduce Performance of Quantitative PCR Assays. *Clinical Chemistry*, 59(10), 1470–1480. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203653>
- Lesk, A. M. . (2019). *Introduction to bioinformatics* (5th ed., Vol. 1). Oxford University Press.
- Lopez-Jimena, B., Bekaert, M., Bakheit, M., Frischmann, S., Patel, P., Simon-Loriere, E., Lambrechts, L., Duong, V., Dussart, P., Harold, G., Fall, C., Faye, O., Sall, A. A., & Weidmann, M. (2018). Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(5), e0006381. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006381>
- Lynch, C. R. H., Drummond, R. S. M., Jelley, L., Baker, L., Smit, E., Fleming, R., & Billington, C. (2025). Optimization and Benchmarking of RT-LAMP-CRISPR-Cas12a for the Detection of SARS-CoV-2 in Saliva. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5), 1806. <https://doi.org/10.3390/ijms26051806>
- Maljkovic Berry, I., Rutvisuttinunt, W., Sippy, R., Beltran-Ayala, E., Figueroa, K., Ryan, S., Srikanth, A., Stewart-Ibarra, A. M., Endy, T., & Jarman, R. G. (2020). The origins of dengue and chikungunya viruses in Ecuador following increased migration from Venezuela and Colombia. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-1596-8>
- Messer, P. W., Arndt, P. F., & Lässig, M. (2005). Solvable Sequence Evolution Models and Genomic Correlations. *Physical Review Letters*, 94(13), 138103. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.138103>
- Mietzner, T. A. ., Carroll, K. C. ., Hobden, J. A. ., Miller, Steve., Morse, S. A. ., Mitchell, T. G. ., Sakanari, J. A. ., McKerrow, J. H. ., & Detrick, Barbara. (2016). *Medical Microbiology* (27th ed., Vol. 1). McGraw-Hill Education.

- Miranda, P., Alves, P. A., do Monte-Neto, R. L., & Weber, G. (2024). In silico Thermodynamic Evaluation of the Effectiveness of RT-LAMP Primers for SARS-CoV-2 Variants Detection. *The Open COVID Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.2174/0126669587279780240130063422>
- Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15(2), 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), 63e–663. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Onoja, B. A., Maiga, M., Adesola, R. O., Adamu, A. M., & Adegboye, O. A. (2023). Changing Ecotypes of Dengue Virus 2 Serotype in Nigeria and the Emergence of Cosmopolitan and Asian I Lineages, 1966–2019. *Vaccines*, 11(3), 547. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030547>
- OPS. (2015). *Dengue: Guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas* (Organización Panamericana de la Salud, Ed.; 2nd ed., Vol. 1). Organización Panamericana de la Salud. <https://iris.paho.org/items/0832bcad-f6b2-4c52-bb28-eac8f587fb6e>
- OPS. (2025). *Actualización epidemiológica: Dengue*. Organización Panamericana de La Salud. <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-dengue-region-americas-18-febrero-2026>
- Oscorbin, I., & Filipenko, M. (2023). Bst polymerase — a humble relative of Taq polymerase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 4519–4535. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.09.008>

- Oscorbin, I., Novikova, L. M., & Filipenko, M. L. (2022). Comparison of Reverse Transcriptase (RT) Activities of Various M-MuLV RTs for RT-LAMP Assays. *Biology*, *11*(12), 1809. <https://doi.org/10.3390/biology11121809>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server), W163–W169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, *18*(6), 407–421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Postler, T. S., Beer, M., Blitvich, B. J., Bukh, J., de Lamballerie, X., Drexler, J. F., Imrie, A., Kapoor, A., Karganova, G. G., Lemey, P., Lohmann, V., Simmonds, P., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Kuhn, J. H. (2023). Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Archives of Virology*, *168*(9), 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
- Ptitsyn, K. G., Khmeleva, S. A., Kurbatov, L. K., Timoshenko, O. S., Suprun, E. V., Radko, S. P., & Lisitsa, A. V. (2024). Lamp Primer Designing Software: The Overview. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, *7*(4), e00226. <https://doi.org/10.18097/BMCRM00226>
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing* (4.5.2; pp. 1–2). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

- Rico-Mendoza, A., Porras-Ramírez, A., Chang, A., Encinales, L., & Lynch, R. (2019). Co-circulation of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Colombia from 2008 to 2018. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.49>
- Rivero, R., Tique-Salleg, V., Echeverri-De la Hoz, D., Damodaran, L., Paternina, D., Santos-Vega, M., Torres-Hernández, D., Davalos, D., López-Medina, E., Breban, M. I., Arrieta, G., Miranda, J., Hill, V., Grubaugh, N. D., & Mattar, S. (2026). Genomic epidemiology of dengue virus 2 and 3 reveals repeated introductions and exportations of several lineages in Colombia. *Cell Reports*, 45(1), 116844. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.116844>
- Rodríguez-Morales, A. J., López-Medina, E., Arboleda, I., Cardona-Ospina, J. A., Castellanos, J. E., Faccini-Martínez, Á. A., Gallagher, E., Hanley, R., Lopez, P., Mattar, S., Pérez, C. E., Kastner, R., Reynales, H., Rosso, F., Shen, J., Villamil-Gómez, W. E., & Fuquen, M. (2025). The Epidemiological Impact of Dengue in Colombia: A Systematic Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(1), 182–188. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0907>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sambrook, Joseph., Fritsch, E. F. ., & Maniatis, Tom. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (1st ed., Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of

the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20–D26.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Frisse, L., Pruitt, K. D., Schneider, V. A., Underwood, B. A., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2025). GenBank 2025 update. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D56–D61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1114>

Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*, 10(8), 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>

Subali, A. D., & Wiyono, L. (2021). Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Pathogens and Global Health*, 115(5), 281–291. <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1933335>

Taki, K., Yokota, I., Fukumoto, T., Iwasaki, S., Fujisawa, S., Takahashi, M., Negishi, S., Hayasaka, K., Sato, K., Oguri, S., Nishida, M., Sugita, J., Konno, S., Saito, T., & Teshima, T. (2021). SARS-CoV-2 detection by fluorescence loop-mediated isothermal amplification with and without RNA extraction. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27(2), 410–412. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.10.029>

Tanner, N. A., & Evans, T. C. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Nucleic Acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, 105(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>

Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual Detection of Isothermal Nucleic Acid Amplification Using pH-Sensitive Dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>

- Theys, K., Libin, P., Dallmeier, K., Pineda-Peña, A.-C., Vandamme, A.-M., Cuypers, L., & Abecasis, A. B. (2017). Zika genomics urgently need standardized and curated reference sequences. *PLOS Pathogens*, *13*(9), e1006528. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006528>
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, *3*(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Tullayaprayouch, K., Phuadraksa, T., Luk-In, S., Pornsuwan, S., Changkhundi, P., Wichit, S., & Yainoy, S. (2025). Development of multiplex recombinase polymerase amplification for the rapid detection of five carbapenemase (blaKPC, blaNDM, blaOXA-48-like, blaIMP, and blaVIM) and 10 mcr (mcr-1 to mcr-10) genes in blood cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *66*(4), 107567. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2025.107567>
- Villabona-Arenas, C. J., de Oliveira, J. L., Capra, C. de S., Balarini, K., Loureiro, M., Fonseca, C. R. T. P., Passos, S. D., & Zanotto, P. M. de A. (2014). Detection Of Four Dengue Serotypes Suggests Rise In Hyperendemicity In Urban Centers Of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(2), e2620. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002620>
- WHO. (2009). *Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control* (WHO, Ed.; 1st ed., Vol. 1). World Health Organization. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/bfc4c8fb-776e-4f1b-b29e-8309d5a15702/content>
- WHO. (2024). *WHO launches global strategic plan to fight dengue*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/03-10-2024-who-launches-global-strategic-plan-to-fight-rising-dengue-and-other-aedes-borne-arboviral-diseases>
- Wilder-Smith, A., Ooi, E.-E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *The Lancet*, *393*(10169), 350–363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32560-1)

- Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., & Chee, H.-Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(3), 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Yang, N., Zhang, H., Han, X., Liu, Z., & Lu, Y. (2024). Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview. *Frontiers in Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1406632>
- Yenamandra, S. P., Koo, C., Chiang, S., Lim, H. S. J., Yeo, Z. Y., Ng, L. C., & Hapuarachchi, H. C. (2021). Evolution, heterogeneity and global dispersal of cosmopolitan genotype of Dengue virus type 2. *Scientific Reports*, *11*(1), 13496. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92783-y>
- Yung, C.-F., Lee, K.-S., Thein, T.-L., Tan, L.-K., Gan, V. C., Wong, J. G. X., Lye, D. C., Ng, L.-C., & Leo, Y.-S. (2015). Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(5), 999–1005. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0628>
- Zhou, Y., Wan, Z., Yang, S., Li, Y., Li, M., Wang, B., Hu, Y., Xia, X., Jin, X., Yu, N., & Zhang, C. (2019). A Mismatch-Tolerant Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method and Its Application on Simultaneous Detection of All Four Serotype of Dengue Viruses. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01056>