

Leptospirosis: Vigilancia de laboratorio para el diagnóstico diferencial con dengue, zika y chikungunya en la Región Brunca, Costa Rica

María J. Ramírez-Vargas¹, María F. Matamoros-Madrigal¹, Diana Chinchilla-Montero²

AFILIACIONES: ¹División de Diagnóstico Molecular, Laboratorio Clínico, Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla, Caja Costarricense del Seguro Social, San Isidro del General, Costa Rica; ²Laboratorio Enfermedades Febriles Zoonóticas, Centro Nacional de Referencia Bacteriología, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, Cartago, Costa Rica.

RESUMEN. La leptospirosis está incluida dentro de las enfermedades de notificación obligatoria; sin embargo, tiene un protocolo de vigilancia desactualizado, las muestras por serología son difíciles de tomar y son escasamente referidas para el diagnóstico y confirmación. Este análisis retrospectivo utilizó las muestras referidas al laboratorio clínico del Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla (HEP-CCSS) durante el primer semestre de 2025 para descartar dengue, zika y chikungunya por métodos moleculares y posteriormente las muestras negativas fueron enviadas a Inciensa para realizar diagnóstico diferencial por leptospirosis. Se detectó dengue en 13.0 % del total referido (n=647). En Inciensa se diagnosticó leptospirosis en 115 de 316 muestras enviadas (36.4%). Un 71.3% de los casos se detectó en personas menores de 40 años y el 95.6% en menores de 65 años. El 97.4% muestreado se recibió en el periodo adecuado de FIS (Fecha de Inicio de Síntomas) de 1 a 5 días. Se encontró diferencia significativa según el hospital de origen de las muestras, observándose una mayor probabilidad de positividad por *Leptospira* en las muestras referidas por el Hospital Manuel Mora Valverde (HMMV-CCSS) ($RR=1.77$; $p=0.001$). Leptospirosis mostró una mayor incidencia que dengue en la Región Brunca para el primer semestre de 2025. La enfermedad afectó a pacientes en edad productiva, lo que supone un alto impacto económico para las comunidades locales. El laboratorio de la Red de Diagnóstico Molecular de la CCSS representa una oportunidad para aprovechar la plataforma instalada y valorar introducir la PCR por *Leptospira* dentro del algoritmo local.

PALABRAS CLAVE. Leptospirosis, Región Brunca, enfermedades febriles, Costa Rica

ABSTRACT. Leptospirosis is a notifiable disease; however, its protocol is outdated, serological samples are difficult to collect, and they are rarely referred for diagnosis and confirmation. This retrospective analysis used samples referred to the clinical laboratory of the Dr. Fernando Escalante Pradilla Hospital (HEP-CCSS) in the first half of 2025 to rule out dengue, zika and chikungunya by molecular methods.

Dirección para correspondencia,
dirigida a:

María J. Ramírez-Vargas
mjramirezv@ccss.sa.cr

Recibido: 10 de noviembre del 2025

Aceptado: 17 de marzo 2026

Publicado: 30 de marzo del 2026

Los artículos publicados en La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos se distribuyen bajo la licencia **Creative Commons Atribución–NoComercial–Compartir Igual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**.

Subsequently, negative samples were sent to Inciensa for diagnosis of leptospirosis. Dengue was detected in 13.0% of the total referred samples (n=647). In Inciensa, leptospirosis was diagnosed in 115 of 316 samples (36.4%). 71.3% of the cases were detected in individuals under 40 years of age, and 95.6% in individuals under 65 years of age. 97.4% of samples were received within the appropriate FIS (Fixed Intake System) period of 1 to 5 days. A significant difference was found according to the hospital of origin of the samples; a higher probability of a positive *Leptospira* test result in samples from the Manuel Mora Valverde Hospital (HMMV-CCSS) ($RR=1.77$; $p=0.001$). Leptospirosis showed a higher incidence than dengue in the Brunca Region in the first half of 2025. The disease affected patients of working age, which represents a significant economic impact on local communities. The Molecular Diagnostic Laboratory Network of the CCSS presents an opportunity to leverage the existing platform and consider incorporating *Leptospira* PCR testing into the local diagnostic algorithm.

KEYWORDS. Leptospirosis, Brunca Region, febrile illnesses, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN. El Protocolo para la prevención y control de la leptospirosis fue publicado por el Ministerio de Salud de Costa Rica en el año 2002 (Ministerio de Salud Costa Rica, 2002). En dicho documento se establecía la confirmación de leptospirosis por métodos serológicos mediante la determinación de IgM anti *Leptospira* en dos muestras cuya diferencia de título fuera igual o mayor a 4 veces; en una muestra aguda y una convaleciente tomada con 2 o 3 semanas de diferencia a partir del día 8 del inicio de síntomas. En el caso de determinarse por la técnica de microaglutinación (MAT), se requiere detectar los anticuerpos anti-leptospirales en un aumento igual o mayor a un título desde la primera muestra.

Si bien es cierto que la leptospirosis está incluida dentro de la vigilancia de las enfermedades febriles (Ministerio de Salud Costa Rica, 2002), el número de muestras referidas por el clínico para descartar este agente es muy discreto o incluso inexistente en algunos centros de la región. Además, la dificultad de tomar mínimo dos muestras por paciente, en días señalados para confirmar un diagnóstico, repercute en el gran subregistro existente de esta enfermedad en las comunidades locales.

Por otra parte, ya en 2008 la Organización Mundial de la Salud menciona las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como un método rápido posible de diagnóstico temprano de la leptospirosis (Organización Mundial de la Salud, 2008). Asimismo, se publicaron protocolos de extracción de ADN y se mencionan secuencias de los genes *rrs* y secuencias blanco combinadas *secY* y *flaB* o el gen *lipL32* para la detección (Ahmed et al., 2009; Ahmed et al., 2020; Galloway & Hoffmaster, 2015).

El Laboratorio de Enfermedades Febriles Zoonóticas (LEFZ) del Centro Nacional de Referencia de Bacteriología (CNRB) de Inciensa es el encargado de realizar la vigilancia basada en laboratorio de la leptospirosis a nivel nacional. El diagnóstico y la vigilancia se realizan por medio de métodos moleculares y serológicos basados en un algoritmo que considera las características de la muestra y los días de evolución del paciente al momento de la toma de la muestra, con el fin de aplicar varias metodologías de manera concomitante y asegurar una mayor sensibilidad en el diagnóstico. La detección molecular se realiza por medio de PCR en tiempo real basado en la detección del gen *lipL32* (Ahmed et al, 2020), mientras que los métodos serológicos consisten en un ensayo ELISA IgM (Serion/Virion, Alemania) y la técnica de microaglutinación (MAT), que es el estándar de oro para el diagnóstico de leptospirosis (OMS, 2008).

A partir del año 2020, como respuesta a la pandemia de COVID-19, la Gerencia de la Caja Costarricense del Seguro Social inicia la creación de una Red de Laboratorios de Diagnóstico Molecular como un esfuerzo institucional para regionalizar dichas tecnologías. Parte de esta iniciativa es la regionalización de las pruebas para la determinación de virología de dengue, zika y chikungunya que a partir de abril del año 2024 se han venido analizando en el Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla (HEP-CCSS) y otros laboratorios de la red.

Dengue y *Leptospira* comparten sintomatología, presentación clínica y contexto epidemiológico-ambiental. Desde agosto del año 2024, y como iniciativa del Inciensa se pidió la colaboración de referir las muestras con resultados de PCR no detectados por dengue, zika y chikungunya con el fin de mejorar la vigilancia de esta enfermedad en la región. Como resultado de esta vigilancia conjunta, se presentan los resultados encontrados.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se trata de un análisis tipo retrospectivo, utilizando como población las muestras de suero y plasma referidas al laboratorio clínico del HEP-CCSS de la Región Brunca, durante el primer semestre del año 2025. Las muestras analizadas fueron recolectadas dentro de los días 0-5 desde la fecha de inicio de síntomas para descartar dengue, zika y chikungunya mediante RT-PCR multiplex (Trioplex).

Las muestras con resultados no detectados para dengue, zika y chikungunya fueron referidas al Inciensa con el fin de descartar la presencia de *Leptospira* mediante pruebas serológicas y moleculares. Las muestras fueron referidas junto con la boleta de Solicitud de Diagnóstico Inciensa-R85, detallando la información de fecha de inicio de síntomas, días de evolución y otros factores de riesgo de exposición. Se utilizó como base de datos la generada por el laboratorio clínico y el expediente único digital en salud (EDUS©) para realizar las consultas correspondientes. Como herramienta para el análisis de los datos se utilizó hoja de cálculo de Microsoft Excel Office© y el software Epi Info©.

Criterios de inclusión: Muestras referidas al laboratorio clínico del Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla de la CCSS en la Región Brunca, para descartar dengue-zika o chikungunya (DZC) por métodos moleculares con 0-5 días desde la fecha de inicio de síntomas (FIS).

Criterios de exclusión:

-Muestras Trioplex negativas por DZC, que no fueron enviadas a Inciensa para descartar presencia de *Leptospira*.

-*Leptospira* confirmadas mediante serología por envío de una segunda muestra.

Extracción de ADN y amplificación por PCR en tiempo real: Las muestras referidas con 1-6 días de evolución desde el inicio de los síntomas fueron analizadas por PCR tiempo real. Para esto se extrajo ADN genómico de 200 µl de suero o plasma utilizando el kit de extracción StarMag 96 y la plataforma automatizada SEEPREP 32 (Seegene, Corea), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN de *Leptospira* patógena se amplificó mediante PCR en tiempo real dirigida al gen *lipL32* (Ahmed et al., 2020) desarrollado por el Centro de Referencia de Leptospirosis del Amsterdam University Medical Center, el cual es un centro de excelencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y referente en leptospirosis a nivel mundial. Las reacciones se corrieron en un sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

Se aplicaron las siguientes condiciones de amplificación: las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µl, compuesto por 1x TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, California, Estados Unidos), primer forward (*lipL32F*, 5'CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTTC3'), primer reverse (*lipL32R*, 5'GGCATTGATTTTCTTCYGGGGTWGCC3') y una sonda marcada con FAM y BHQ1 (5'FAM-AGGCGAAATCGGKGARCCAGGCGAYGG3'-BHQ1), con una concentración final de 0.4 µM para los primers y 0.2 µM para la sonda. Se añadió agua grado biología molecular a un volumen de 15 µl, y posteriormente se añadieron 10 µl de ADN extraído, para un volumen final de reacción de 25 µl.

El protocolo de amplificación se corrió en modo Fast y consistió en 2 min a 50 °C, seguido de 95 °C por 5 minutos y 45 ciclos de amplificación (95 °C durante 20 segundos y 60 °C durante 30 segundos). Las muestras se analizaron por triplicado. Se consideraron positivas las muestras que presentaron Cts < 42.

ELISA IgM: Las muestras referidas con 1-17 días de evolución desde el inicio de los síntomas fueron analizadas por la presencia de anticuerpos antileptospirales de tipo IgM utilizando el Kit Serion ELISA Classic *Leptospira* IgM (Virion/Serion, Alemania), según las instrucciones del fabricante.

Prueba de microaglutinación MAT: Todas las muestras referidas se analizaron por la prueba de MAT (Goris y Hartskeerl, 2014), la cual constituye el estándar de oro para el diagnóstico de leptospirosis. Se utilizó un panel de 31 serovares de referencia de *Leptospira* que comprenden los principales serogrupos patógenos y 5 cepas autóctonas aisladas a partir de muestras PCR positivas.

RESULTADOS. De enero a junio de 2025 se procesaron un total de 647 muestras para descartar dengue, zika y chikungunya, en las que se detectó dengue en 84 muestras para un 13% del total referido. No se detectó zika ni tampoco chikungunya para el mismo periodo. De las muestras en las que no se detectó DZC, un total de 563, fueron enviadas a Inciensa para realizar el diagnóstico de leptospirosis por métodos moleculares y serológicos.

De las 316 muestras enviadas, se diagnosticó leptospirosis por serología en 115 muestras (36.4%), 149 resultaron negativas y 52 muestras presentaron un resultado indeterminado. La positividad observada durante el presente periodo fue superior al porcentaje de positividad reportado a nivel nacional en el año 2025, que alcanzó un 32.49% (SILAB Web, Laboratorio de Enfermedades Febriles Zoonóticas). Por otra parte, en Cajamarca, Perú se encontró un 31,7% de positividad por leptospirosis mediante la técnica MAT, entre muestras previamente testeadas negativas por dengue en el 2019 (Alvarado Dávila et al., 2019), en un estudio de características similares al presente.

Para clasificar las muestras referidas al laboratorio por hospital de origen y determinar su incidencia relativa, se calculó el porcentaje de detección de dengue y *Leptospira*.

El porcentaje de muestras con *Leptospira* detectado se obtuvo de la siguiente manera:

Muestras *Leptospira* detectado/total de muestras enviadas a Inciensa * 100

El porcentaje de muestras con dengue detectado se obtuvo de la siguiente manera:

Muestras dengue detectado/total de muestras procesadas en HEP * 100

Tabla 1. Distribución de casos en muestras referidas al HEP (CCSS).
Región Brunca. Ene-Jun 2025.

Origen	<i>Leptospira</i> detectado casos	(%)	Dengue detectado casos	(%)
HEP	33	28.7	30	35.7
ASBA	7	6.1	1	1.2
HCN	21	18.3	16	19
HMMV	31	27	4	4.8
HJP	2	1.6	2	2.4
HTCC	21	18.3	25	29.8
ASPZ	0	0	6	7.1
Total	115	100	84	100

Nota. HEP: Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla; ASBA: Área de Salud de Buenos Aires; HCN: Hospital Ciudad Neilly; HMMV: Hospital Manuel Mora Valverde; HJP: Hospital Juana Pirola; HTCC: Hospital Tomás Casas Casajús; ASPZ: Área de Salud de Pérez Zeledón. Fuente: BD Laboratorio Clínico. Diagnóstico Molecular, HEP (CCSS). 2025.

RESULTADOS. A nivel global, en la Región Brunca se observa un mayor porcentaje de casos detectados por *Leptospira* que por dengue. Cuando se clasifican los casos por origen se encuentran centros donde es más frecuente *Leptospira*, como el Área de Salud de Buenos Aires (ASBA-CCSS) y Hospital Manuel Mora Valverde (HMMV-CCSS). En otros centros es más frecuente dengue, como en el Hospital Escalante Pradilla (HEP-CCSS) y en el Hospital Tomás Casas Casajús (HTCC-CCSS).

Al caracterizar los casos de leptospirosis por edad, se obtuvo una media de 31 ± 20 años, lo cual muestra una amplia distribución etaria entre los casos confirmados. La mayor proporción de casos se concentró en el grupo de 19 a 40 años (47.8%), seguido por los grupos de 41 a 65 años (24.3%) y 0 a 18 años (23.5%), mientras que los mayores de 65 años representan únicamente el 4.4% de los casos. En conjunto, estos resultados evidencian que la mayor carga de la enfermedad se concentra en población en edad productiva.

La mayoría de las muestras (97,4%) se recibieron dentro del periodo adecuado para diagnóstico molecular según la FIS de 1 a 5 días, lo que indica que la determinación de virología de dengue, en general, está bien establecida entre el personal clínico. Esto podría ser una gran oportunidad diagnóstica para otros patógenos que comparten los mismos signos y síntomas, dentro de la misma ventana de tiempo, como es el caso de determinación por PCR de *Leptospira*.

Tabla 2. Frecuencia acumulada por días desde el inicio de síntomas, en casos de leptospirosis. Región Brunca, 1er semestre 2025.

Días desde inicio de síntoma	Frecuencia	Dengue detectado casos	Porcentaje acumulado (%)
0-1	22	19.1	19.1
2	30	26.1	45.2
3	30	26.1	71.3
4	18	15.7	87.0
5	12	10.4	97.4
>5	3	2.6	100

Fuente: BD Laboratorio Clínico, EDUS. Diagnóstico Molecular, HEP (CCSS). 2025.

Cuando se compararon las muestras según el sexo del paciente, no se encontró diferencia significativa entre ambos sexos para el periodo observado. En cuanto al origen de la muestra, es decir, en el centro que realiza la captación del paciente, se encontró una diferencia significativa en el Hospital Manuel Mora Valverde (HMMV-CCSS) en comparación con las diferentes muestras de la Región ($p = 0,001$). Además, hubo una mayor probabilidad de que la muestra resultara positiva por *Leptospira* cuando era referida por este centro ($RR=1,77$).

Tabla 3. Caracterización de pacientes con leptospirosis por centro de origen. Región Brunca. 1er Semestre 2025.

Características N=316 muestras	n=115 casos	% (n)	Incidencia *1000	Chi2	p	RR
Sexo						
	Masculino Femenino	59.9% (69) 39.1% (45)	59 900 39 100	0,31	0,56	
ASBA	7	1.8	18	0.11	0.74	
HEP	33	8.3	83	3.50	0.06	
HCN	21	5.3	53	1.58	0.21	
HMMV	31	7.8	78	10.65	0.001	1.71
HJP	2	0.5	5	0.62	0.43	
HTCC	21	5.3	53	1.31	0.25	
Total	115					

Nota. HEP: Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla; ASBA: Área de Salud de Buenos Aires; HCN: Hospital Ciudad Neilly; HMMV: Hospital de Golfito Manuel Mora Valverde; HJP: Hospital Juana Pirola; HTCC: Hospital Tomás Casas Casajús; ASPZ: Área de Salud de Pérez Zeledón. Fuente: BD Laboratorio Clínico. Diagnóstico Molecular, HEP (CCSS). 2025.Fuente: BD Laboratorio Clínico. Diagnóstico Molecular, HEP(CCSS). 2025.

DISCUSIÓN. Probablemente la leptospirosis es una enfermedad febril subdiagnosticada en la región. Se encontró una mayor incidencia de casos de leptospirosis en comparación con dengue, zika o chikungunya en la Región Brunca para el primer semestre de 2025, tanto a nivel regional como en cada uno de los centros de salud analizados.

En la Región Brunca, la mayoría de las muestras con leptospirosis corresponden a pacientes en edad productiva, lo que supone un alto impacto económico para las comunidades locales.

Con el laboratorio de la Red de Diagnóstico Molecular de la Caja Costarricense de Seguro Social, existe una buena plataforma en la región para el diagnóstico temprano de la leptospirosis. Actualmente, el clínico ya se encuentra familiarizado con el envío de muestras aptas para la determinación de patógenos dentro de una fecha de inicio de síntomas igual o menor a 5 días, lo que representa una oportunidad para aprovechar la plataforma instalada en el Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla y valorar la introducción de la PCR para *Leptospira* dentro del algoritmo diagnóstico local.

DISCUSIÓN. Es importante mencionar que, debido a la patogénesis de la enfermedad, en la cual los niveles de leptospiremia disminuyen progresivamente, es indispensable la realización de métodos serológicos de manera concomitante en todas las muestras analizadas por biología molecular. De igual manera, las muestras positivas por PCR deben ser enviadas a Inciensa para su confirmación y aislamiento de *Leptospira* (Chinchilla et al., 2025).

Con las muestras referidas por el Hospital Manuel Mora Valverde (HMMV-CCSS), donde se ha visto una diferencia significativa, se podría iniciar la validación de la prueba de PCR para *Leptospira* y su posterior aplicación dentro de la Red de Diagnóstico Molecular.

En cuanto a otras diferencias observadas, se requieren estudios más profundos sobre factores de riesgo y un mayor tamaño muestral para poder establecer mejores conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, A., Engelberts, M. F. M., Boer, K. R., Ahmed, N., & Hartskeerl, R. A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLOS ONE*, 4(9), e7093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>

Ahmed, A. A., Goris, M. G. A., & Meijer, M. C. (2020). Development of lipL32 real-time PCR combined with an internal and extraction control for pathogenic *Leptospira* detection. *PLOS ONE*, 15(11), e0241584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241584>

Alvarado Dávila, X., Gavidia Olivera, E. Y., Zulueta Vásquez, B. N., & Romani, F. (2019). Leptospirosis en pacientes con resultado negativo para dengue, zika y chikungunya en Jaén, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 36(3), 535-540. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4457>

Chinchilla, D., Sánchez, I., Montero, D. et al. In-house isolation protocol from human serum samples demonstrates the circulating of a broad diversity of *Leptospira* serogroups in Costa Rica. *Sci Rep* 15, 9614 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93301-0>

Galloway, R. L., & Hoffmaster, A. R. (2015). Optimization of LipL32 PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(3), 199-200. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.024>

Goris, M. G. A. & Hartskeerl, R. A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr Protoc Microbiol* 32, 1–18 (2014).

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2002). *Protocolo para la prevención y control de la leptospirosis*. Ministerio de Salud Publishing. <https://www.binasss.sa.cr/opac-ms/media/digitales/Leptospirosis%20-%20Protocolo%20para%20Prevenci%C3%B3n%20y%20Control.pdf>

Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control* (Traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa). Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS.