

***Naegleria fowleri* en cuerpos de agua dulce naturales de Costa Rica: descripción de
potenciales territorios nosogénicos en sitios recreativos en 2023**

JOHAN ANDREY ALVARADO OCAMPO

Tesis presentada para optar al grado de *Magíster Scientiae* en Epidemiología del
Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales cumple con los requisitos
establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional,

Heredia, Costa Rica

UNIVERSIDAD NACIONAL

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



***Naegleria fowleri* en cuerpos de agua dulce naturales de Costa Rica: descripción de potenciales territorios nosogénicos en sitios recreativos en 2023**

JOHAN ANDREY ALVARADO OCAMPO

Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, Marzo 2025

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar al grado académico de *Magíster Scientiae* en Epidemiología

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

[Dr. Randall Gutiérrez Vargas / Dra. Damaris Castro García / Dr. Jorge Herrera Murillo / Dr. José Vega Baudrit / Dr. Greivin Rodríguez Calderón / Dra. Rocío Castillo Cedeño]

Representante del Consejo Central de Posgrado

Silvia Argüello Vargas, MSc
Coordinadora del Programa de Posgrado

Dra. Lissette Retana Moreira, PhD
Tutora de tesis

Dr. Juan José Romero Zúñiga, PhD
Miembro del Comité Asesor

Dr. Leonel Córdoba Gamboa, PhD
Miembro del Comité Asesor

Johan Andrey Alvarado Ocampo
Sustentante

RESUMEN GENERAL

Dentro del grupo de las amebas de vida libre (AVL) de la familia Vahlkampfiidae, de amplia distribución en la naturaleza, el género *Naegleria* destaca por comprender especies adaptadas a altas temperaturas como la ameba parásita facultativa *N. fowleri*, causante de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). *Naegleria* spp. y otros vahlkämpfidos se pueden encontrar en entornos terrestres y acuáticos variados, donde pueden entrar en contacto con el ser humano.

La caracterización y evaluación de cuerpos de agua es fundamental para conocer la presencia de microorganismos patógenos y el riesgo de infección. En este trabajo se realizó una encuesta de condiciones ambientales en fuentes naturales de agua dulce utilizadas para la visitación turística y recreativa en Costa Rica durante 2023, con el fin de determinar la presencia de AVL de la familia Vahlkampfiidae capaces de crecer a temperaturas elevadas como 42 °C, identificar parámetros fisicoquímicos y geoespaciales relacionados con la presencia de *N. fowleri* o *Naegleria* spp., y describir el perfil de conocimientos, actitudes y prácticas (CAP) de las personas con relación a la infección por *N. fowleri*.

Para cumplir con los objetivos propuestos, se muestreó agua y sedimentos de veinticuatro lugares y se midieron parámetros como temperatura, pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto en agua. Del agua, además, se realizó cultivo a 42 °C, aislamiento y PCR, resultando en veinte sitios positivos por AVL vahlkämpfidas (83,3 %), siete de los sitios positivos por *Naegleria* (29,2 %) pero todos negativos por *N. fowleri*. La identificación por secuenciación basada en el amplicón de la PCR de familia taxonómica detectó *Tetramitus* spp. predominantemente, seguida de *Vahlkampfia* sp. y *Neovahlkampfia* sp. En el sedimento se realizaron determinaciones de metales, cationes y análisis de

textura. Hubo asociación estadística significativa ($p < 0,05$) entre el oxígeno disuelto, la conductividad del agua, el cobre y el porcentaje de arcilla en sedimento con la presencia de *Naegleria* spp., aunque la asociación epidemiológica no lo fue. Los sitios presentaron un predominio de cobertura forestal y se ubicaron en regiones subclimáticas con patrones de lluvia importantes. Además, se aplicó una encuesta de CAP a 72 personas entre 18 y 66 años, de las cuales un 37,5 % no había escuchado sobre *N. fowleri*, y se obtuvo puntajes generales de 35,8 % de conocimiento, y 3,01 y 2,16 para actitudes y prácticas, siendo cinco el valor más favorable o de menor riesgo. Las pruebas estadísticas arrojaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el nivel de conocimiento según el género y la procedencia de la persona.

Este trabajo señala que, de manera general, los sitios incluidos en este estudio poseen características ambientales (agua, sedimento, clima) adecuadas para la permanencia de *Naegleria* spp. y otras AVL en ellos; indica además que *N. fowleri* posiblemente enfrenta retos ecológicos por fenómenos de competencia. Sin embargo, dada la variabilidad de los parámetros medidos y el número limitado de sitios, no se obtuvo una relación clara con la presencia de *Naegleria* spp. Además, los resultados evidencian una alta frecuencia de AVL termotolerantes en aguas superficiales no termales con capacidad de proliferar a altas temperaturas, lo que puede hacer posible que *N. fowleri* esté presente.

La encuesta CAP evidencia bajo nivel de conocimiento y deficiencias en el manejo y prevención del riesgo de MAP en la muestra de la población encuestada y expuesta a reservorios naturales de agua dulce. Los hallazgos de esta encuesta de condiciones ambientales representan un aporte importante en el conocimiento sobre la presencia de *Naegleria* spp. y otras vahlkämpfidias en reservorios naturales de agua de Costa Rica y un punto de partida para sistematizar el monitoreo de AVL potencialmente patógenas en entornos de estrecho contacto con el ser humano.

GENERAL ABSTRACT

Within the group of free-living amoebae (FLA) of the Vahlkampfiidae family, which are widely distributed in nature, the genus *Naegleria* stands out for including species adapted to high temperatures, such as the facultative parasitic amoeba *N. fowleri*, the causative agent of primary amebic meningoencephalitis (PAM). *Naegleria* spp. and other vahlkampfiids can be found in diverse terrestrial and aquatic environments, making contact with people.

The characterization and evaluation of water bodies is essential to determine the presence of pathogenic microorganisms and assess the risk of infection. This study proposed an environmental survey of natural freshwater sources used for tourism and recreational activities in Costa Rica during 2023. The objectives were to detect the presence of thermotolerant FLA of the Vahlkampfiidae family, identify physicochemical and geospatial parameters related to the presence of *N. fowleri* or *Naegleria* spp., and describe the knowledge, attitudes, and practices (KAP) of individuals regarding *N. fowleri* infection.

In order to accomplish the objectives of this work, water and sediment samples were collected from twenty-four locations, measuring parameters such as temperature, pH, electrical conductivity, and dissolved oxygen. Additionally, water samples were cultured at 42 °C, followed by isolation and PCR. Results showed that 20 sites (83,3 %) tested positive for vahlkampfiid FLA, seven sites (29,2 %) tested positive for *Naegleria*, but all were negative for *N. fowleri*. PCR amplicon sequencing for taxonomic identification predominantly detected *Tetramitus* spp., followed by *Vahlkampfia* sp. and *Neovahlkampfia* sp. In sediment samples, metal, cation, and texture analyses were performed. Although dissolved oxygen, water conductivity, copper concentration, and clay percentage in sediment were statistically associated ($p < 0,05$) with the presence of *Naegleria* spp., epidemiological association was not demonstrated. The sampled sites were mainly covered by forest and located in

subclimatic regions with significant rainfall patterns. Additionally, a KAP survey was conducted with 72 individuals aged 18 to 66 years. Results showed that 37,5 % had never heard of *N. fowleri*, with overall scores of 35,8 % for knowledge, 3,01 for attitudes, and 2,16 for practices, where five represents the most favorable or lowest-risk response. Statistical tests revealed significant differences ($p < 0,05$) in knowledge levels based on gender and place of origin.

This study suggests, in general terms, that the sites included in the research possess environmental characteristics (water, sediment, climate) suitable for the persistence of *Naegleria* spp. and other FLA. Additionally, *N. fowleri* may face ecological challenges due to competitive interactions. However, given the variability of the measured parameters and the limited number of sites, no clear relationship was established with the frequency of *Naegleria* spp. Furthermore, results indicate a high prevalence of thermotolerant FLA in non-thermal surface waters capable of thriving at high temperatures, indicating the potential presence of *N. fowleri*. The KAP survey highlights a low level of knowledge and deficiencies in risk management and prevention of PAM among people exposed to natural freshwater reservoirs. The findings of this environmental survey contribute significantly to the understanding of *Naegleria* spp. and other vahlkampfiids in Costa Rican water bodies, providing a valuable foundation for future systematic monitoring of potentially pathogenic FLA in environments with close human interaction.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a mi Comité Asesor y a la formación y soporte administrativo brindado por el Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales de la Universidad Nacional (UNA). Al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Costa Rica (UCR) y la Beca para Investigación Científica Dra. Luz Claudio - Mount Sinai Scientific Scholarship “International Training in Environmental Health over the Lifespan” del programa de colaboración entre la UNA y Icahn School of Medicine at Mount Sinai de Nueva York, por su apoyo administrativo, logístico y financiero.

A Lissette, Elizabeth, Víctor, Frida y todas aquellas personas investigadoras y estudiantes de la UCR que se involucraron en el trabajo de campo, trabajo de laboratorio y análisis de datos, en quienes reconozco su inigualable entrega, contribución y decidido apoyo a mi crecimiento académico y profesional.

A Juan José y Leonel, por sus enseñanzas y valiosos aportes para presentar hallazgos novedosos y de utilidad para la línea de investigación y esta área del conocimiento.

A mi familia, por quienes siempre todo ha valido la dicha.

DEDICATORIA

Esta tesis está pensada para contribuir al acervo de conocimiento sobre uno de los eventos de salud de origen infeccioso más descuidados o ignorados. A todas las personas que padecieron o sufren de una enfermedad sistemáticamente desatendida por las autoridades de salud pública y la práctica privada, la dedicatoria de este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
DESCRIPTORES	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REFERENCIAS	18
ARTÍCULO I	31
Resumen y palabras clave	31
Introducción y objetivo	34
Materiales y métodos	38
Resultados	43
Discusión	51
Consideraciones éticas y declaración de conflictos de interés	58
Agradecimientos	58
Referencias bibliográficas	59
ARTÍCULO II	71
Resumen y palabras clave	71
Introducción y objetivo	74
Materiales y métodos	77
Resultados	81
Discusión	90
Consideraciones éticas y declaración de conflictos de interés	99
Agradecimientos	99
Referencias bibliográficas	100
CONCLUSIONES	113
RECOMENDACIONES	115
ANEXOS	118

LISTA DE CUADROS

ARTÍCULO I:

Cuadro 1. Caracterización de regiones subclimática donde se encontraron los lugares con positividad molecular por <i>Naegleria</i> , de acuerdo con el Instituto Meteorológico Nacional.	Pág. 46
Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos medidos en agua y sedimento de los sitios de muestreo, según su positividad (POS)/negatividad (NEG) molecular por <i>Naegleria</i> y en total.	47
Cuadro 3. Clasificación de sedimentos muestreados según el tipo de textura y la positividad (POS)/negatividad (NEG) molecular del sitio por <i>Naegleria</i> .	48
Cuadro 4. Medida de asociación (OR) cruda entre las variables independientes y la presencia de <i>Naegleria</i> . en los cuerpos de agua dulce.	50

ARTÍCULO II:

Cuadro 1. Detección por PCR de AVL de la familia Vahlkampfiidae (VAHL) y el género <i>Naegleria</i> en aislamientos realizados a partir de cuerpos de agua dulce visitados para la recreación, por región geográfico-administrativa.	82
Cuadro 2. Frecuencia absoluta y relativa de aspectos sociodemográficos de las personas visitantes de cuerpos de agua dulce para la recreación que fueron encuestadas durante los muestreos en 20 sitios de colecta.	84
Cuadro 3. Porcentaje total y desagregado, por ítem de respuestas correctas, para la evaluación de CONOCIMIENTOS sobre la infección por <i>Naegleria fowleri</i> en personas visitantes de cuerpos de agua dulce para la recreación.	86
Cuadro 4. Frecuencia del tipo de respuesta ofrecida para cada ítem de ACTITUDES y PRÁCTICAS, con relación a la visitación en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por <i>Naegleria fowleri</i> .	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biología y ecología de <i>Naegleria</i> : sus formas evolutivas se pueden encontrar en la naturaleza y entornos modificados por el hombre. La disponibilidad de alimento, su capacidad de adaptación metabólica, la posibilidad de transitar por estadios flagelados y las condiciones del entorno determinan su capacidad de sobrevivencia en diferentes ecosistemas. Para hacer frente de forma eficiente a las potenciales adversidades del entorno requiere de modificaciones bioquímicas y genéticas, como las adaptaciones postraduccionales y el intercambio de genes. Tomado y adaptado de: Dereeper et al. (2023).	Pág. 3
Figura 2. Ciclo de vida y principal ruta de transmisión de diferentes infecciones causadas por amebas de vida libre. Ac: <i>Acanthamoeba</i> , Bm: <i>Balamuthia mandrillaris</i> , Nf: <i>Naegleria fowleri</i> . Tomado y adaptado de CDC (2024): https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html	4
ARTÍCULO I:	
Figura 1. Mapa de Costa Rica, indicando las regiones que constituyeron las áreas de estudio. Elaboración propia.	39
Figura 2. Identificación molecular de <i>Naegleria</i> (región ITS) en submuestras de agua. M: marcador de peso molecular en pares de bases (bp); C+: control positivo (ADN de <i>N. fowleri</i>); C-: control negativo.	44
Figura 3. Sitios de muestreo con el detalle de aquellos en los que se aislaron AVL cuya identificación por PCR coincidió con <i>Naegleria</i> . Los puntos se muestran sobre una capa de coropletas de subregiones climáticas brindada por el Instituto Meteorológico Nacional. De las muestras de agua tomadas en todos estos puntos, solamente en HCA1 y HNO2 no hubo aislamiento de AVL a 42 °C. El método de PCR detectó material genético de <i>Naegleria</i> . en las subregiones climáticas PN2 (1), RN5 (1), RA3 (4) y RN1 (1). PN: Pacífico Norte, RN: Región Norte, RA: Región Atlántica. Elaboración propia.	44
Figura 4. Área de influencia (2826 m ²) de los sitios muestreados y representación de la cobertura de uso de suelo dentro de cada una: bosque (verde), pastos (rojo), cultivos (amarillo) y edificaciones (gris). El color lavanda a otros usos de suelo, como vías terrestres o el cauce de los cuerpos de agua. Elaboración propia.	49

ARTÍCULO II:

- Figura 1. AVL de la familia Vahlkampfiidae aisladas a partir de diferentes cuerpos de agua. Los colores representan el número de submuestras de agua cultivadas a 42 °C positivas (blanco: 0, púrpura: 1, verde: 2, azul: 3, naranja: 4) y el punto negro central es indicativo de PCR para familia taxonómica positiva. La zona amarilla (izquierda) corresponde a la Región Chorotega, la zona café (centro) a la Región Huetar Norte y la roja (derecha) a la Región Huetar Caribe. Elaboración propia. **83**
- Figura 2. Frecuencia de visitación a cuerpos de agua dulce para la recreación, por género. Elaboración propia. **85**
- Figura 3. Procedencia de las personas que contestaron la encuesta CAP. El número y la intensidad del color representan la cantidad de encuestados que declararon cada cantón resaltado como su sitio de residencia. Elaboración propia. **85**
- Figura 4. Escalamiento de Likert para evaluación de actitudes con relación a la visitación en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*. La línea roja representa la puntuación general. También se incluyen los valores de puntuación desagregada por grupo de edad (púrpura y azul) y género (amarillo y verde). Elaboración propia. **87**
- Figura 5. Escalamiento de Likert para evaluación de prácticas con relación a la visitación en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*. La línea roja representa la puntuación general. También se incluyen los valores de puntuación desagregada por grupo de edad (púrpura y celeste) y género (amarillo y verde). Elaboración propia. **88**
- Figura 6. Escalamiento de Likert para evaluación de actitudes y prácticas con relación a la visitación en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*. Se incluyen los valores de puntuación desagregada por categoría de procedencia: GAM (naranja), No GAM (azul) y persona extranjera (rosa). Elaboración propia. **88**

LISTA DE ABREVIATURAS

AIC: Criterio de Información de Akaike (del inglés “Akaike Information Criterion”)

AyA: Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados

ADN: ácido desoxirribonucleico

AVL: amebas de vida libre

CAP: conocimientos, actitudes y prácticas

CBio: Comisión Institucional de Biodiversidad

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (del inglés “Centers for Disease Control and Prevention”)

CEC: Comité Ético Científico

CIA: Centro de Investigaciones Agronómicas

CIET: Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales

DE: desviación estándar

EE. UU.: Estados Unidos de América

FEM: género femenino

GAM: Gran Área Metropolitana

IC 95 %: intervalo al 95 % de confianza

ITS: espaciador transcrito interno (del inglés “internal transcribed spacer”)

MAS: género masculino

MAP: meningoencefalitis amebiana primaria

MINAE: Ministerio de Ambiente y Energía

NEG: negativo

NMP: número más probable

LCR: líquido cefalorraquídeo

OR: razón de momios o razón de posibilidades (del inglés “odds ratio”)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)

PN: Pacífico Norte

POS: positivo

RA: Región Atlántica

RIC: rango intercuartílico

RN: Región Norte

UCR: Universidad de Costa Rica

UNA: Universidad Nacional

VAHL: familia taxonómica Vahlkampfiidae

DESCRIPTORES

ARTÍCULO I:

Naegleria, agua dulce, sedimento, fisicoquímico, textura, uso de suelo

ARTÍCULO II:

Vahlkampfiidae, *Naegleria fowleri*, recreación, riesgo, conocimientos, actitudes, prácticas

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las infecciones por amebas de vida libre (AVL) como *Naegleria fowleri* son eventos poco estudiados, con determinantes epidemiológicos desconocidos. Por la biología y ecología de estas amebas, se postula que el componente ambiental del fenómeno podría modular el riesgo de infección en entornos de estrecho contacto con el ser humano, como lo son cuerpos de agua utilizados para la recreación (Heggie, 2010; Ghapure, 2021). Siendo que estos lugares pueden constituir territorios nosogénicos para la infección con *N. fowleri* y otras AVL, es relevante realizar una descripción de las características generales que favorecen la permanencia de la ameba en estos ecosistemas, así como de la población potencialmente expuesta.

Eventualmente, a partir de información que trace la línea base, será posible desarrollar protocolos de vigilancia ambiental. Por lo tanto, la pregunta generadora que se plantea en este trabajo de investigación es: ¿cuáles son las características ambientales asociadas a la presencia de AVL como *Naegleria* spp. en diferentes fuentes de agua dulce naturales utilizadas para la recreación turística en aquellas regiones de Costa Rica relacionadas a los casos que se han presentado en el país, así como el perfil sociodemográfico y conductual de las personas visitantes de estos sitios de recreo durante 2023?

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1. Generalidades y relevancia clínica de las amebas de vida libre

Las AVL son microorganismos eucariotas unicelulares (protozoarios), ubicuos en la naturaleza y de distribución mundial, que habitan en ambientes terrestres, acuáticos y en sus interfases, y poseen un papel importante en el control de las poblaciones bacterianas.

Asimismo, las condiciones climáticas y del entorno, tales como la temperatura, el pH y los nutrientes disponibles regulan su permanencia en estos ambientes (Figura 1) (Griffin, 1983).

De forma general, en su ciclo de vida existen formas vegetativas para la multiplicación, el desplazamiento y alimentación conocidas como trofozoítos, así como quistes que le confieren protección a adversidades del entorno (18). Algunas de estas amebas se denominan anfizoicas, pues exhiben la capacidad de hacer parasitismo facultativo al momento de ingresar al cuerpo humano y establecer una infección, lo que las convierte en potencialmente patógenas (Martínez & Visvesvara, 1997).

Es de particular interés, cuando se ha trabajado con AVL con temperaturas óptimas de crecimiento elevadas o cepas que toleran altas temperaturas, los resultados que sugieren una asociación con una virulencia incrementada en estos aislamientos, evidenciada así por medio del efecto citopático y patogenicidad en animales de laboratorio (Griffin, 1972; Rivera et al., 1983; Castro-Artavia et al., 2017).

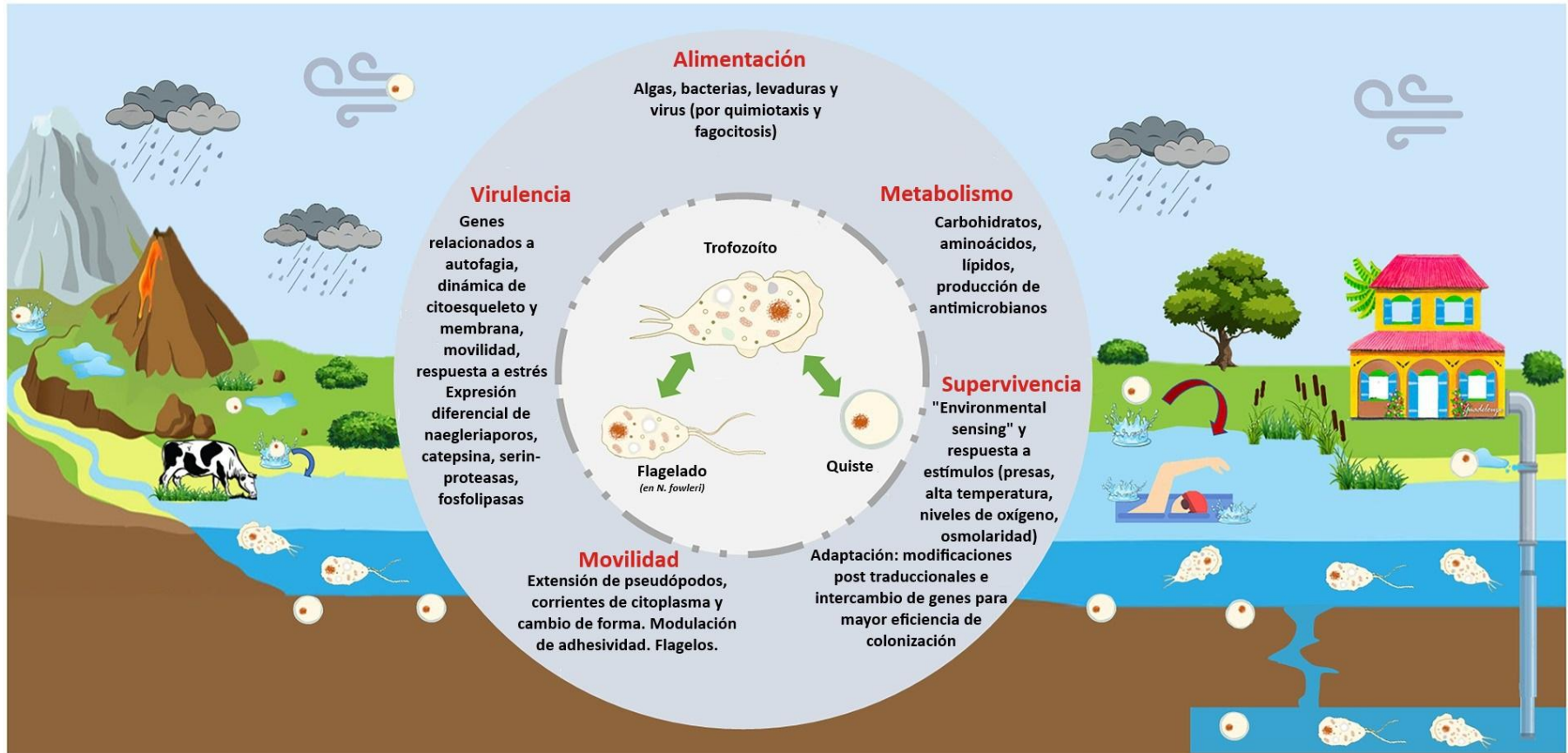


Figura 1. Biología y ecología de *Naegleria*: sus formas evolutivas se pueden encontrar en la naturaleza y entornos modificados por el hombre. La disponibilidad de alimento, su capacidad de adaptación metabólica, la posibilidad de transitar por estadios flagelados y las condiciones del entorno determinan su capacidad de sobrevivencia en diferentes ecosistemas. Para hacer frente de forma eficiente a las potenciales adversidades del entorno requiere de modificaciones bioquímicas y genéticas, como las adaptaciones postraduccionales y el intercambio de genes. Tomado y adaptado de: Dereeper et al. (2023).

Las AVL más comúnmente asociadas al desarrollo de patologías son las pertenecientes al género *Acanthamoeba* (principalmente del genotipo T4) y *Naegleria fowleri*, ambas con capacidad de provocar cuadros a nivel de sistema nervioso central (encefalitis granulomatosa amebiana y meningoencefalitis amebiana primaria, respectivamente) (Visvesvara et al., 2007; Sarink et al., 2022).

En el caso de *Acanthamoeba*, es posible además la producción de manifestaciones clínicas a nivel de ojo (queratitis amebiana) y piel. Asimismo, se han asociado las amebas *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia* spp. con la aparición de casos de enfermedad en el ser humano (Siddiqui & Khan, 2008; Qvarnstrom et al., 2009; Delafont et al., 2018). En la Figura 2 se describen los ciclos de vida de algunas AVL con potencial patogénico en el contexto de su interacción con el ser humano como hospedero.

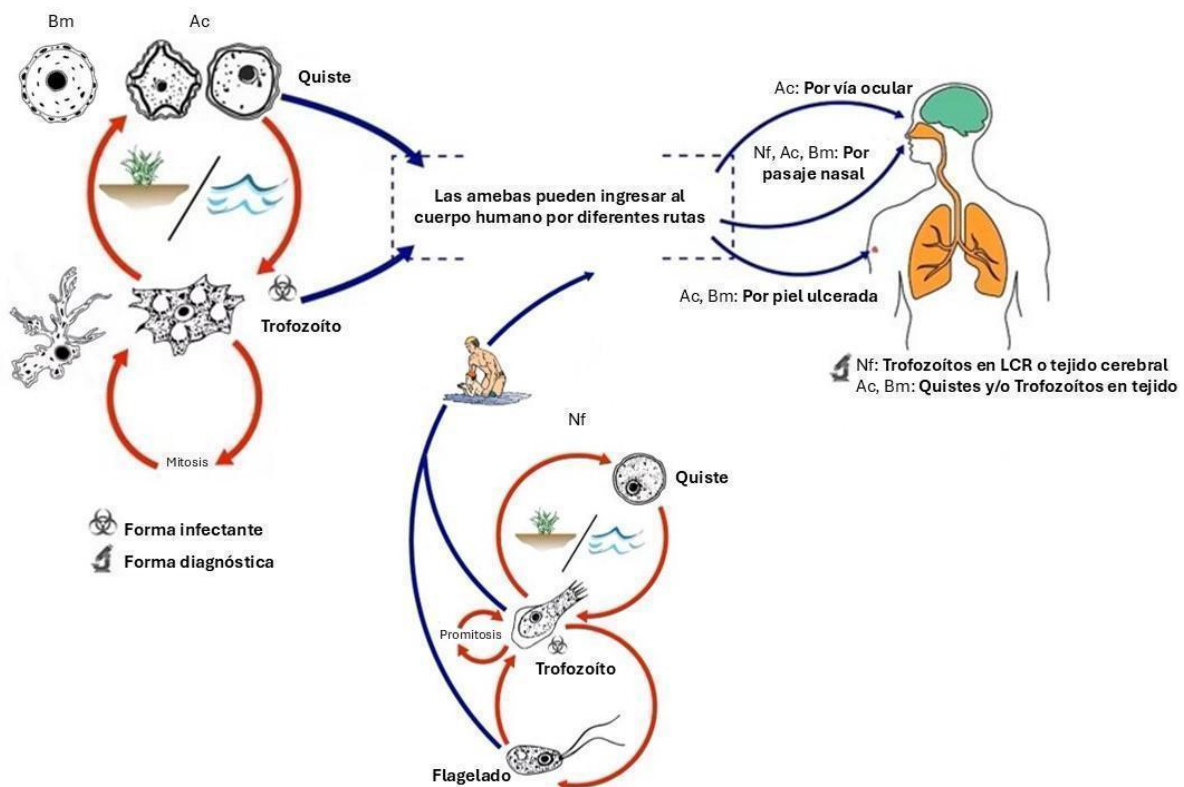


Figura 2. Ciclo de vida y principal ruta de transmisión de diferentes infecciones causadas por amebas de vida libre. Ac: *Acanthamoeba*, Bm: *Balamuthia mandrillaris*, Nf: *Naegleria fowleri*. Tomado y adaptado de CDC (2024): <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>

Más allá de su rol directo como agentes etiológicos, se considera que las AVL son verdaderos reservorios ambientales para bacterias con potencial patogénico como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp., que resisten y permanecen viables dentro de las amebas, así como otras que se adaptan a la vida intracelular (Greub & Raoult, 2004).

Los avances en la comprensión de los mecanismos de patogenicidad y la información genómica deben ser fundamentales para cerrar la brecha en investigación que existe sobre las AVL y las infecciones que provocan (Rodríguez-Anaya et al., 2021), que se han catalogado también como enfermedades desatendidas, y cuyas consecuencias van en incremento (Angelici et al., 2021).

2.2. Biología y ecología de *Naegleria* spp. y *Naegleria fowleri*

Las amebas del género *Naegleria*, quizá el más estudiado y mejor conocido, pertenecen a la clase taxonómica Heterolobosea, orden Schizopyrenida, familia Vahlkampfiidae, un grupo parafilético que contiene a la mayoría de heterolobóseos (Pánek & Čepička, 2012). Otras amebas vahlkámpfidas son *Vahlkampia*, *Pseudovahlkampfia*, *Allovahlkampfia*, *Paravahlkampfia*, *Neovahlkampfia*, *Tetramitus*, *Paratetramitus*, *Trimastigamoeba*, *Tetramastigamoeba*, *Lyromonas*, *Heteramoeba*, *Adelphamoeba*, *Pleurostomum*, *Tulamoeba*, *Fumarolamoeba*, *Didascalus*, *Psalteriomonas*, *Willaertia*, *Marinamoeba*, y *Percolomonas* (Patterson et al., 2000; Pánek & Čepička, 2012). Esta familia se caracteriza por la presencia de un núcleo tipo limax y por la persistencia del nucleolo durante la mitosis (Pánek & Čepička, 2012) en sus organismos y, como otros heterolobóseos, pueden presentar formas ameboides, quísticas o flageladas (Patterson et al., 2000).

Estas amebas son heterotróficas; muchas se alimentan de bacterias, aunque se ha descrito también el fenómeno de canibalismo. Poseen un amplio rango de hábitats (principalmente suelos y sedimentos asociados a cuerpos de agua) y se han hallado en ambientes extremos de salinidad, temperatura y pH; algunos miembros son termofílicos, a diferencia de otras AVL (Pánek & Čepička, 2012).

Dentro del género *Naegleria*, la diferenciación de especies debe hacerse por medio de las secuencias ITS y 5.8S del ADN ribosomal, y muchas de estas son termofílicas (la mayoría se han encontrado en temperaturas máximas entre los 30 °C y los 45 °C), lo que les permite tolerar hasta los 45 °C en el caso de *N. fowleri* (Schuster & Visvesvara, 2004), *N. lovaniensis*, *N. niuginensis*, *N. martinezi*, *N. carteri*, *N. endoi* y *N. johanseni*, mientras otras como *N. australiensis*, *N. italica*, *N. pussardi*, *N. jamiesoni*, *N. morganensis*, *N. sturti*, *N. tihangensis*, *N. byersi*, *N. laresi* y *N. tenerifensis* también exhiben crecimiento por encima de los 40 °C. *Naegleria* spp. han sido reportadas en todos los continentes, excepto en la Antártida (De Jonckheere, 2014), colonizan ambientes con muy variado aporte nutricional y debe alimentarse de otros microorganismos (Figura 1).

En una descripción pangénómica del género, se encontraron genes involucrados en quimiotaxis, fagocitosis, expresión de receptores, actividad enzimática y versatilidad metabólica, lo que posiblemente se relacione con su necesidad de afrontar cambios drásticos de su entorno (Dereeper et al., 2023).

De cerca de 47 especies conocidas dentro del género, *N. fowleri* es la única con capacidad patogénica y letal demostrada. Esta especie produce una infección a nivel cerebral conocida como meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) (Butt, 1966), la cual puede afectar individuos sanos e inmunocompetentes; esta es calificada como una enfermedad infecciosa emergente susceptible al cambio climático (Jahangeer et al., 2020; Maciver et al., 2020) y destaca por ser rara, pero aguda y fulminante. Sin embargo, cabe

destacar que ha habido hallazgos puntuales no concluyentes de otras amebas vahlkámpfidas como *Paravahlkampfia francinae*, *Tetramitus ovis* y *Vahlkampfia* sp., involucradas en procesos infecciosos en seres humanos (Pánek & Čepička, 2012) y se ha sugerido el potencial patogénico de *N. australiensis* y *N. italica* (De Jonckheere, 2002).

En el ciclo de vida de *N. fowleri*, además de la forma infectante, el trofozoíto (10-25 μm), y la de resistencia, el quiste (8-20 μm), se presenta un estadio flagelado piriforme (10-16 μm) que le permite desplazarse en momentos de déficit de nutrientes (Visvesvara et al., 2007). El trofozoíto presenta lobópodos, es uninucleado y capaz de multiplicarse por fisión binaria, con temperaturas de crecimiento óptimas que oscilan desde los 25 °C hasta por encima de los 35 °C, mientras que la forma flagelada se presenta incluso desde los 27 °C y hasta los 37 °C, no se multiplica y se caracteriza por presentar dos flagelos que facilitan su desplazamiento. Los quistes de doble pared se forman bajo condiciones adversas y se encuentran a temperaturas muy inferiores a los 27 °C; además, son capaces de resistir la desecación (Gupta & Das, 1999; Jahangeer et al., 2020; Stahl & Olson, 2023).

Tanto los quistes como los trofozoítos de esta ameba son inactivados por cloro, monocloramina y dióxido de cloruro (Dupuy et al., 2014), y se reporta un menor hallazgo de la ameba conforme más cercanía haya con puntos de cloración en sistemas de agua para consumo (Morgan et al., 2016).

N. fowleri se encuentra en sedimentos superficiales y de ríos (Lares-Villa & Hernández Peña, 2010; Moussa et al., 2015), en cuerpos de agua dulce naturales como ríos, aguas termales, aguas subterráneas (Moussa et al., 2013; Baquero et al., 2014; Bright & Gerba, 2017; Fabros et al., 2021; Krishnamoorthi et al., 2022) y en sistemas de agua para consumo (Coşkun et al., 2013; Yousuf et al., 2013). Se ha postulado que las aguas subterráneas podrían constituir el principal reservorio de *N. fowleri* y la fuente a partir de la cual llega la ameba a las aguas superficiales (Maciver et al., 2020).

Una serie de determinantes influye en la distribución y abundancia de *N. fowleri* en el ambiente, como la temperatura y la osmotolerancia (Maciver et al., 2020). Además, las amebas del género *Naegleria* se relacionan con la presencia de bacterias, cianobacterias, y biofilm (Chang, 1958; Kyle, 1985; Puzon et al., 2017), pues constituye su fuente de alimentación y la disponibilidad de estas “presas” en el sedimento es particularmente esencial, pues es el lugar en el que el trofozoíto las ingiere adherido al sustrato (Maciver et al., 2020).

Dada su ventajosa capacidad para crecer a temperaturas superiores a los 30 °C (a las que otras AVL no pueden), *N. fowleri* se ve inmersa en ambientes propicios para su proliferación debido a la escasa competencia ecológica (Griffin, 1983). Sin embargo, el calentamiento global y la termofilicidad de esta ameba pueden conformar una sinergia que conlleve a hábitats favorecidos para el patógeno, con un incremento de sus poblaciones y, finalmente, un mayor riesgo de infección (Maciver et al., 2020).

2.3. Meningoencefalitis amebiana primaria: abordaje clínico y prevención

La ruta de infección de *N. fowleri* al hospedador susceptible es la entrada forzosa, accidental o circunstancial de la ameba en su forma de trofozoíto a la cavidad nasal por acción de las actividades acuáticas (Maciver et al., 2020). Se adhiere a la mucosa olfatoria y, al lograr evadir la respuesta inmune innata, irrumpe entre el neuroepitelio olfatorio para ingresar al sistema nervioso central (Shibayama et al, 2013; Cope et al., 2020). A nivel cerebral, el patógeno provoca daño tisular extensivo con inflamación, con predominio de neutrófilos, hemorragia y necrosis (Cervantes-Sandoval et al., 2008) gracias a la adhesión y acción enzimática que induce un efecto citopático (Visvesvara, 2013), lo que convierte a la infección en un cuadro clínico fulminante.

Los síntomas se desarrollan tras 1-9 días post infección (Cope et al., 2020). Típicamente se puede presentar la aparición de fiebre, cefalea, rigidez en el cuello, náuseas y sensación de cansancio, disminución del nivel de alerta y somnolencia; en algunos casos, se puede presentar fotofobia, alteraciones en el gusto y el olfato, incremento de la presión intracraneal, confusión, convulsiones y coma (Güémez, 2021; Sarink et al., 2022). Ante la ausencia de sintomatología específica y, con ello, la falta de sospecha a la hora de realizar el diagnóstico, este suele ser post mórtem. La muerte se presenta entre los días 7 y 10 posterior al inicio de síntomas (Visvesvara, 2013).

El diagnóstico de la MAP se realiza por medio del estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenido por punción lumbar. El análisis bioquímico presenta valores normales o bajos de glucosa con alto contenido proteico, mientras que la observación microscópica asistida por tinción de Giemsa evidencia abundantes leucocitos polimorfonucleares y la presencia de amebas que pueden confundirse con otras células humanas (Visvesvara, 2013). A partir de esta muestra, también es posible cultivar en agar no nutritivo suplementado con enterobacterias e incubando a 37 °C durante una semana; para diferenciar de otras amebas patógenas se puede realizar un ensayo de exflagelación, con el fin de identificar la forma flagelada transitoria (Güémez & García, 2021).

Los estudios neurológicos de imagen pueden mostrar inflamación de las meninges y obstrucción de los compartimentos por donde circula el LCR (Singh et al., 2006). Para el diagnóstico molecular se ha explorado el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Madarová et al., 2010; Aykur et al., 2022; Oncel et al., 2022); en diversas plataformas: tiempo real adaptadas a plataformas anidadas (Réveiller et al., 2002) o multiplex para la detección simultánea de otras AVL patógenas (Qvarnstrom et al., 2006), hasta secuenciación de nueva generación (Huang et al., 2021).

La supervivencia en esta infección es baja por el rápido progreso del daño; muy pocos de los casos se han recuperado (Gharpure et al., 2021a) y el régimen terapéutico idóneo es desconocido (Grace et al., 2015; Güémez & García, 2021). Al reto que supone el manejo de la MAP, se suma la necesidad de un tiempo de respuesta oportuno. En este complejo contexto, el tratamiento agresivo con anfotericina B de administración intravenosa e intratecal (directamente en cavidades cerebrales) es la opción más utilizada (Capewell et al., 2015; Grace et al., 2015). Además, se ha probado también con combinaciones de antimicrobianos como rifampicina, miltefosina, fluconazol y azitromicina (Visvesvara, 2013; Jahangeer et al., 2020; Güémez & García, 2021).

Con respecto a las medidas de prevención, dada la estrecha relación con ambientes acuáticos, se habla de asegurar los niveles de cloración adecuados en piscinas, así como evitar el agua no potable y priorizar el uso de agua tratada, destilada, esterilizada y filtrada para la preparación de soluciones para lavados o enjuagues nasales (Jahangeer et al., 2020). La educación sanitaria sobre el fenómeno, a través de estrategias de comunicación entre poblaciones en edad escolar y en establecimientos recreativos, es ideal para concientizar sobre la necesidad de promover el equipo de protección personal (tapones o prensas para la nariz) durante la estancia en aguas termales u otro tipo de cuerpo de agua natural o artificial y evitar: i) la entrada de agua a través de las fosas nasales durante las actividades acuáticas, ii) la remoción o la acción de sacudir el sedimento y iii) la recreación en aguas que se calienten durante épocas de mayor temperatura (CDC, 2024).

2.4. Estado de situación sobre amebas de vida libre en Costa Rica

En Costa Rica, los primeros hallazgos de AVL asociados a seres humanos fueron publicados en 1979, aunque no vinculados a cuadros clínicos, pero a partir de muestras de heces e hisopados nasales, a través de los cuales se logró el aislamiento de *Hartmannella* sp., *Acanthamoeba* sp. y *Naegleria* sp. Algunos de estos microorganismos con capacidad

patogénica demostrada en ratones (Chinchilla et al., 1979). Posteriormente, en 2006 se reportó un caso de una meningoencefalomielitis granulomatosa no supurativa en una vaca, que se atribuyó a *N. fowleri* por técnicas inmunofluorescentes en cortes histológicos (Morales et al., 2006).

En el país se han aislado y caracterizado tanto *Balamuthia mandrillaris* como *Acanthamoeba* T4 a partir de diferentes superficies inertes como las de unidades dentales y unidades combinadas de emergencia de laboratorios (Retana-Moreira et al., 2014; Retana-Moreira et al., 2015; Castro-Artavia et al., 2017).

En la historia reciente del país, destaca el reporte del primer caso fatal asociado a Costa Rica en un niño estadounidense de 11 años diagnosticado en su país de origen y, quien días antes de desarrollar la sintomatología asociada a la MAP, visitó un complejo turístico de aguas termales en la zona de La Fortuna de San Carlos, esto en el año 2014 (Abrahams-Sandí et al., 2015). Asimismo, en 2020 se diagnosticaron tres casos: dos de ellos asociados a balnearios de aguas termales (Guanacaste y San Carlos), y uno relacionado a un pozo artesanal subterráneo (Limón) (Retana Moreira et al., 2020a). En todos los casos, se trató de menores con edades de quince, cinco y un año, respectivamente. Además, el microorganismo fue aislado de todas las fuentes de agua implicadas en los casos, con excepción del caso de la niña de cinco años, en el que no se solicitó el muestreo, pero que destaca por ser, de los cuatro casos, el único en el que se trataba de una paciente femenina y de las pocas recuperaciones exitosas, a nivel mundial, tras la aplicación de tratamiento (Abrahams-Sandí et al., 2015; Retana Moreira et al., 2020a).

Los casos clínicos relacionados a otras AVL como *Acanthamoeba* también se han dado ocasionalmente. Existe el reporte de un caso con nexo epidemiológico con el país por un masculino venezolano que visitó zonas boscosas de Costa Rica y, posteriormente, en

su país de origen, fue biopsiado por una lesión cerebral de la que se aisló *Acanthamoeba* (Wagner et al., 2011). Esta ameba también se aisló de una paciente adulta mayor con antecedente de empleo terapéutico de lentes de contacto por lesión previa del epitelio corneal, lo que le condujo a una queratitis amebiana. Eventualmente, por pruebas moleculares se logró identificar a la ameba dentro del genotipo T4 (Rodríguez Mena et al., 2017).

Durante el año 2020, dada la alerta y conmoción mediática generada por la sucesión de tres casos de MAP en relativamente corto tiempo, así como el descenso en la visitación a centros recreativos y turísticos de aguas termales, el Ministerio de Salud emitió una serie de comunicados sobre el riesgo de transmisión, haciendo énfasis en que la transmisión no se daba de persona a persona. Además, medidas de acatamiento para el disfrute seguro como: i) evitar sumergirse o usar naricera en aguas termales dada la ruta de infección (vía nasal), ii) rotulación para advertir sobre el riesgo de adquirir la infección, iii) prohibición de trampolines o toboganes que descarguen en piscinas de origen termal natural, y iv) exigencia de limpieza de superficies y entubación del sitio de captación del agua termal, las dos últimas puestas en firme mediante una modificación el reglamento de manejo de piscinas (Ministerio de Salud, 2020a, 2020b, 2020c).

El ente rector también acudió a la Universidad de Costa Rica (UCR) con el fin de muestrear y obtener la confirmación de la presencia de la ameba en las fuentes de agua de los sitios de infección, resultando en hallazgos positivos de aislamiento y detección molecular (Jiménez Córdoba, 2020a, 2020b). En la Sección de Protozoología Médica de la Facultad de Microbiología, el grupo de investigación en AVL se ha centrado en el estudio y caracterización molecular de los aislamientos clínicos de *N. fowleri* de 2020. Sus últimos trabajos en el tema lograron describir vesículas extracelulares de AVL en términos de

tamaño y de su perfil proteico (Retana Moreira et al., 2020b; Retana Moreira et al., 2022; Retana Moreira et al., 2024).

En referencia al monitoreo de aguas, las aguas subterráneas para potabilización (pozos y nacientes) son muestreados por el Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), el cual determina, bajo criterios de calidad microbiológicos y fisicoquímicos, conteos de coliformes fecales, *Escherichia coli* y una serie de parámetros organolépticos (temperatura, turbiedad, color, pH, conductividad), además de dureza, nitratos, metales pesados y metaloides (hierro, cadmio, manganeso, arsénico), cloruros, fluoruros y plaguicidas (Mora-Alvarado et al., 2016).

Por otro lado, a la Dirección de Agua del Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE) le corresponde ejecutar un Plan Nacional de Monitoreo de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales de Costa Rica (MINAE, 2021), de conformidad con lo establecido por el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua (Decreto Ejecutivo N.º 33903, 2007); en este caso, se abarcan ríos, arroyos, quebradas, lagos, lagunas y embalses de diversas cuencas hidrográficas a nivel país, con el fin de analizar coliformes fecales, oxígeno disuelto, alcalinidad, fosfato, nitrato, pH, turbiedad y la demanda bioquímica de oxígeno, y con la posibilidad de adicionar parámetros complementarios según las características de la zona de muestreo, además del monitoreo biológico de macroinvertebrados dulceacuícolas. En ninguno de los casos se hace la evaluación rutinaria por protozoarios intestinales ni AVL.

3. JUSTIFICACIÓN

Algunos géneros y especies de AVL cuentan con la capacidad de comportarse como parásitos facultativos al ingresar y establecerse en el ser humano, produciendo infecciones de diversa severidad. La MAP, por ejemplo, es un cuadro poco frecuente, pero fulminante,

sin tratamiento efectivo para todos los casos y con una letalidad entre el 95 y 99 % (Jahangeer et al., 2020). A la fecha, a nivel mundial, se tiene un registro subestimado de alrededor de 431 casos (Maciver et al., 2020), en el que la mayoría de las personas infectadas han sido personas con datos de edad desde los ocho meses hasta los 66 años, pero con un 62,2 % de estos siendo menores de 13 años (Yoder et al., 2010).

En Costa Rica, además del reporte de infecciones por *Acanthamoeba*, se diagnosticaron tres casos de MAP en 2020, relacionados a balnearios de aguas termales de Guanacaste y San Carlos, y un pozo artesanal en Limón (Retana Moreira et al., 2020a). En 2014, también, se asoció el fallecimiento de un niño estadounidense que visitó nuestro país pocos días antes de iniciar la sintomatología relacionada con el cuadro clínico (Abrahams-Sandí et al., 2015). Además, se ha aislado tanto *Naegleria fowleri* como *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris* de diversos entornos, acuáticos y no acuáticos, modificados por el hombre (Retana Moreira et al., 2014; Abrahams-Sandí & Retana-Moreira, 2015).

Si bien los datos epidemiológicos evidencian un bajo riesgo de infección, es importante reconocer que puede existir un subregistro de casos dada la falta de protocolos específicos de vigilancia de estos cuadros, así como protocolos diagnósticos y recursos para el aislamiento e identificación de los patógenos ante la sospecha clínica, agravado por la sintomatología inespecífica que implica la necesidad de un diagnóstico diferencial con infecciones oculares y meningitis bacterianas, virales y fúngicas (Matanock et al., 2018; Jahangeer et al., 2020; Gharpure et al., 2021a).

Naegleria spp. habitan en suelos y aguas de regiones tropicales y subtropicales. Se han encontrado en sedimentos (Lares-Villa & Hernández Peña, 2010; Moussa et al., 2015), cuerpos de agua dulce, aguas termales y aguas subterráneas (Bright & Gerba, 2017; Fabros et al., 2021; Krishnamoorthi et al., 2022), y en sistemas de suministro de agua

(Coşkun et al., 2013; Yousuf et al., 2013); también se han encontrado en cuerpos de agua modificados por el ser humano como piscinas recreativas (Rivera et al., 1983; Reyes-Batlle et al., 2017). Consecuentemente, el principal factor de riesgo para la MAP son las actividades recreativas acuáticas que facilitan la entrada del patógeno por vía nasal, y la mayoría de los casos se han reportado en épocas cálidas de verano (Gharpure et al, 2021a; Yoder et al., 2010).

N. fowleri prolifera ante la elevación de temperaturas hasta los 45 °C, lo que reduce la competencia en su nicho ecológico. Siendo que esta ameba presenta cambios en su distribución y abundancia dependiendo de la temperatura, se considera además un agente susceptible a los efectos del cambio climático (Cooper et al., 2019); por tal razón, la MAP es un evento emergente en regiones templadas que se han visto afectadas por el fenómeno climático de elevación de temperatura promedio (Gharpure et al., 2021b). Por otro lado, la disponibilidad de cianobacterias y coliformes resulta fundamental para la ameba, pues constituye su fuente de alimentación (Maciver et al., 2020), de modo que las modificaciones ambientales por intervenciones humanas y los desastres naturales que alteran las poblaciones bacterianas podrían incidir en su presencia en el entorno.

Según la literatura, no se han identificado trabajos que aborden el análisis geoespacial para describir interrelaciones ecológicas con *Naegleria* spp. u otras amebas vahlkámpfidas que influyan en su permanencia en el entorno. Asimismo, según Stahl & Olson (2021), en la mayoría de los casos los estudios sobre características fisicoquímicas no han aportado hallazgos concluyentes, por lo que se requiere explorar el tema.

A pesar de su ubicuidad en la naturaleza y distribución mundial, poco se ha estudiado sobre los factores ambientales que determinan su presencia en lugares normalmente visitados por turistas como los cuerpos de agua naturales, creando una brecha en el conocimiento sobre la ecología de esta ameba (Stahl & Olson, 2021). Por lo

tanto, resulta muy importante identificar estos determinantes con el fin de crear conciencia sobre la recreación segura en estos sitios.

A raíz de los casos de MAP ocurridos en Costa Rica, la ameba se ha aislado e identificado a partir de las fuentes de agua que se relacionaron con las muertes (Abrahams-Sandí et al., 2015; Retana Moreira et al., 2020a); sin embargo, no se ha investigado su presencia en aguas superficiales naturales de diferentes puntos geográficos ni en diferentes momentos del año. Por lo tanto, en nuestro país no se cuenta con información base sobre la prevalencia ambiental de *Naegleria* spp. y, en general, el perfil epidemiológico completo es complicado de estudiar en este evento con componentes ambientales, conductuales y biológicos inexplorados.

Los resultados que ofrece este trabajo permitirán a los tomadores de decisión en salud pública en Costa Rica el definir pautas de vigilancia ambiental como estrategia de monitoreo del riesgo en fuentes naturales de agua (Malik et al., 2022), una necesidad patente por la susceptibilidad del evento a las modificaciones del entorno (Maciver et al., 2020), así como generar alertas tempranas y planificar nuevas formas de comunicación para la prevención de casos de MAP asociados a sitios recreativos y fuentes de agua (Saberí et al., 2020). También, ponen sobre la palestra la necesidad de atender con mayor rigurosidad e integralidad el impacto sanitario derivado de la afectación antropogénica del entorno.

En el presente trabajo se desarrolló un estudio epidemiológico transversal descriptivo y analítico para identificar potenciales territorios nosogénicos susceptibles al cambio climático y con las condiciones ambientales para albergar a *Naegleria* spp. u otras amebas similares. Este corresponde a una encuesta de vigilancia ambiental con análisis moleculares que pretende, no solo recabar información sobre parámetros fisicoquímicos y geoespaciales relacionados a la ameba, sino también determinar el perfil de los visitantes

de estos sitios en términos de su comportamiento y conocimiento en relación con el cuadro patológico y el riesgo de infección. El proyecto está inscrito ante la Vicerrectoría de Investigación de la UCR y contó con las facilidades de la Sección de Protozoología Médica y del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Facultad de Microbiología. Asimismo, como propuesta es parte de un proyecto de investigación que recibió fondos de la Beca para Investigación Científica Dra. Luz Claudio, del programa de colaboración entre la Universidad Nacional (UNA) y la Icahn School of Medicine at Mount Sinai de Nueva York.

La epidemiología enfocada en las exposiciones, como lo es en este caso la presencia del agente en sitios de potencial contagio, colabora en la caracterización de las acciones que pueden contrarrestarlas (Méndez Paz, 2011). En consecuencia, la información derivada de este trabajo provee evidencia para generar nuevas hipótesis de trabajo multidisciplinario para la gestión ambiental de las infecciones por AVL e identificar patrones espaciales de distribución geográfica de estos microorganismos, abre espacio para el estudio del cambio climático en relación con enfermedades emergentes y tiende puentes con otros grupos de investigación nacionales e internacionales para impulsar proyectos epidemiológicos relacionados a AVL potencialmente patógenas.

REFERENCIAS

Abrahams-Sandí, E., & Retana-Moreira, L. (2015). Primer aislamiento e identificación molecular de *Naegleria fowleri* en Costa Rica. *Rev. Colegio de Microb. Quim. Clin.*, 21(1), 27–28.

Abrahams-Sandí, E., Retana-Moreira, L., Castro-Castillo, A., Reyes-Battle, M., Lorenzo-Morales, J. (2015). Fatal Meningoencephalitis in Child and Isolation of *Naegleria fowleri* from Hot Springs in Costa Rica. *Emerging Infect Dis.*, 21(2):382–4. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141576>

Angelici, M.C., Walochnik, J., Calderaro, A., Saxinger, L., Dacks, J.B. (2021) Free-living amoebae and other neglected protistan pathogens: Health emergency signals? *Eur J Protistol.*, 1, 77. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2020.125760>

Aykur, M., Dirim Erdogan, D., Selvi Gunel, N., Guler, A., Biray Avci, C., Celebisoy, N., Gunduz, C., Dagci, H. (2022). Genotyping and Molecular Identification of *Acanthamoeba* Genotype T4 and *Naegleria fowleri* from Cerebrospinal Fluid Samples of Patients in Turkey: Is it the Pathogens of Unknown Causes of Death? *Acta Parasitol.*,67(3):1372–83. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00597-3>

Baquero, R.A., Reyes-Battle, M., Nicola, G.G., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Esteban, J.G., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J. (2014). Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathog Glob Health.*,108(4):206–11. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000143>

Bright, K.R. & Gerba, C.P. (2017). Revue: Présence de l'amibe pathogène *Naegleria fowleri* dans les eaux souterraines. *Hydrogeol J.*,25:953–8. <https://doi.org/10.1007/s10040-017-1582-4>

Butt, C.G. (1966). Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med.*,1473–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM196606302742605>

Capewell, L.G., Harris, A.M., Yoder, J.S., Cope, J.R., Eddy, B.A., Roy, S.L., Visvesvara, G.S., Fox, L.A., Beach, M.J. (2015). Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. *J Pediatric Infect Dis Soc.*, 4(4):e68–75. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu103>

Castro-Artavia, E., Retana-Moreira, L., Lorenzo-Morales, J., Abrahams-Sandí, E. (2017). Potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotype T4 isolated from dental units and emergency combination showers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*,112(12):817–21. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170147>

Centers for Disease Control and Prevention. (5 junio, 2024). Free-living amoebic infections [Internet]. <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (9 octubre, 2024). About *Naegleria fowleri* Infections [Internet]. <https://www.cdc.gov/naegleria/about/index.html>

Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V., Shibayama, M. (2008). Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol Int.*,57(3):307–13. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.006>

Chang, S. L. (1958). Cultural, cytological and ecological observations on the amoeba stage of *Naegleria gruberi*. *Journal of General Microbiology*, 18(3), 565–573.

<https://doi.org/10.1099/00221287-18-3-565>

Chinchilla, M., Castro, E., Alfaro, M., & Portilla, M. (1979). Amebas de vida libre productoras de meningoencefalitis. Primeros hallazgos en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 213, 135–142.

Cooper, A. M., Aouthmany, S., Shah, K., & Rega, P. P. (2019). Killer amoebas: Primary amoebic meningoencephalitis in a changing climate. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 32(6), 30–35. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000558238.99250.4a>

Cope, J. R., Ali, I. K., & Visvesvara, G. S. (2020). Pathogenic and opportunistic free-living amoeba infections (pp. 814–820). En: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (Tenth Edition). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00107-1>

Coşkun, K. A., Özçelik, S., Tutar, L., Elaldi, N., & Tutar, Y. (2013). Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *BioMed Research International*, Article 675145. <https://doi.org/10.1155/2013/675145>

Gobierno de Costa Rica. (17 setiembre, 2007). Decreto No. 33903-MINAE-S: Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales. *Diario Oficial La Gaceta*. <https://imprentanacional.go.cr/gaceta/?date=11/01/2022>

Dirección de Agua. (2021). Plan nacional de monitoreo de la calidad de los cuerpos de agua superficiales de Costa Rica. Ministerio de Ambiente y Energía.

De Jonckheere, J. F. (2002). A Century of Research on the Amoeboflagellate Genus *Naegleria*. In *Acta Protozool* (Vol. 41).

De Jonckheere, J. F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*, 145(S), S2–S9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.011>

Delafont, V., Rodier, M. H., Maisonneuve, E., & Cateau, E. (2018). Vermamoeba vermiformis: A free-living amoeba of interest. *Microbial Ecology*, 76(4), 991–1001. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1199-8>

Dereeper, A., Allouch, N., Guerlais, V., Garnier, M., Ma, L., De Jonckheere, J. F., Joseph, S. J., Ali, I. K. M., Talarmin, A., & Marcelino, I. (2023). *Naegleria* genus pangenome reveals new structural and functional insights into the versatility of these free-living amoebae. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1056418>

Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M. H., et al. (2014). Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(2–3), 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007>

Fabros, M. R. L., Diesta, X. R. S., Oronan, J. A., Verdejo, K. S., Garcia, J. A. S. M., Romey, M. S., et al. (2021). Current report on the prevalence of free-living amoebae (FLA) in natural hot springs: A systematic review. *Journal of Water and Health*, 19(4), 563–574. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.101>

Gharpure, R., Bliton, J., Goodman, A., Ali, I. K. M., Yoder, J., & Cope, J. R. (2021a). Epidemiology and clinical characteristics of primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: A global review. *Clinical Infectious Diseases*, 73(E19–E27). <https://doi.org/10.3201/eid2701.202119>

Gharpure, R., Gleason, M., Salah, Z., Blackstock, A. J., Hess-Homeier, D., Yoder, J. S., et al. (2021b). Geographic range of recreational water-associated primary amebic

meningoencephalitis, United States, 1978–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 27(1), 271–274. <https://doi.org/10.3201/eid2701.202119>

Grace, E., Asbill, S., & Virga, K. (2015). *Naegleria fowleri*: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 6677–6681. <https://doi.org/10.1128/AAC.01293-15>

Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>

Griffin, J. L. (1972). Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science*, 178(4063), 869–870. <https://doi.org/10.1126/science.178.4063.869>

Griffin, J. L. (1983). The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*? Environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *Journal of Protozoology*, 30(2), 403–409. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1983.tb02939.x>

Gupta, S., & Das, S. R. (1999). Stock cultures of free-living amoebas: Effect of temperature on viability and pathogenicity. *Journal of Parasitology*, 85(1), 167–170. <https://www.jstor.org/stable/3285719>

Güemez, A., & García, E. (2021). Primary amoebic meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and treatments. *Biomolecules*, 11(9), Article 1320. <https://doi.org/10.3390/biom11091320>

Heggie, T. W. (2010). Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.06.001>

Huang, S., Liang, X., Han, Y., Zhang, Y., Li, X., & Yang, Z. (2021). A pediatric case of primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* diagnosed by next-generation sequencing of cerebrospinal fluid and blood samples. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), Article 1036. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06932-9>

Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. E. A., Tahir, I. M., Akram, M., et al. (2020). *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(2), 199–212. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13192>

Jiménez Córdoba, J. (14 febrero, 2020a). Acción rápida: Científicas de la UCR detectan un nuevo caso de la ameba “*Naegleria fowleri*.” *Universidad de Costa Rica*. <https://ucr.ac.cr/noticias>

Jiménez Córdoba, J. (28 enero, 2020b). Los análisis de la ameba “*Naegleria fowleri*” en aguas termales dieron positivo. *Universidad de Costa Rica*. <https://ucr.ac.cr/noticias>

Krishnamoorthi, S., Sharma, C., Mewara, A., & Khurana, S. (2022). Environmental water surveillance for free-living amoeba in North India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(3), 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.05.002>

Kyle, D. E., & Noblet, I. (1985). Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *Journal of Protozoology*, 32(1), 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03022.x>

Lares-Villa, F., & Hernández-Peña, C. (2010). Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Experimental Parasitology*, 126(1), 33–36. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.011>

Maciver, S. K., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2020). Is *Naegleria fowleri* an emerging parasite? *Trends in Parasitology*, 36, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.008>

Madarová, L., Trnková, K., Feiková, S., Klement, C., & Obernauerová, M. (2010). A real-time PCR diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri*. *Experimental Parasitology*, 126(1), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.001>

Malik, M. W., Awan, U. A., Ahmed, H., Missaghi, B., & Afzal, M. S. (2022). Environmental surveillance of *Naegleria fowleri*: A way forward for control of primary amoebic meningoencephalitis cases in Pakistan. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 45. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.102235>

Martinez, A. J., & Visvesvara, G. S. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*, 7, 583–598. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1997.tb01076.x>

Matanock, A., Mehal, J. M., Liu, L., Blau, D. M., & Cope, J. R. (2018). Estimation of undiagnosed *Naegleria fowleri* primary amoebic meningoencephalitis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 24(1), 162–164. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu103>

Méndez Paz, F. (2011). The role of environmental epidemiology in its disciplinary development.

Ministerio de Salud. (7 enero 2020a). Confirmado extraño caso de meningitis amebiana primaria en joven de 15 años. *Ministerio de Salud*. <https://ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa>

Ministerio de Salud. (14 febrero, 2020b). Exigen rotulación de advertencia, altura máxima y prohibición de toboganes que desboquen en aguas termales. *Ministerio de Salud*. <https://ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa>

Ministerio de Salud. (20 febrero, 2020c). Autoridades aclaran que no estamos en alerta sanitaria por meningitis amebiana. *Ministerio de Salud*.

<https://ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa>

Morales, J. A., Chaves, A. J., Visvesvara, G. S., & Dubey, J. P. (2006). *Naegleria fowleri*-associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 139(1–3), 221–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.011>

Morgan, M. J., Halstrom, S., Wylie, J. T., Walsh, T., Kaksonen, A. H., Sutton, D., & et al. (2016). Characterization of a drinking water distribution pipeline terminally colonized by *Naegleria fowleri*. *Environmental Science & Technology*, 50(6), 2890–2898. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05657>

Moussa, M., de Jonckheere, J. F., Guerlotté, J., Richard, V., Bastarud, A., Romana, M., & et al. (2013). Survey of *Naegleria fowleri* in geothermal recreational waters of Guadeloupe (French West Indies). *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054414>

Moussa, M., Tissot, O., Guerlotté, J., de Jonckheere, J. F., & Talarmin, A. (2015). Soil is the origin for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters. *Parasitology Research*, 114(1), 311–315. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4197-x>

Oncel, K., Karaagac, L., Dagci, H., & Aykur, M. (2022). Real-time PCR confirmation of a fatal case of primary amoebic meningoencephalitis in Turkey caused by *Naegleria fowleri* or brain-eating amoeba. *Acta Parasitologica*, 67(2), 697–704. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00514-0>

Pánek, T., & Čepička, I. (2012). Diversity of Heterolobosea. *InTech Open*. <https://www.intechopen.com/chapters/28886>

Patterson, D.J., Rogerson, A., & Vørs, N. (2000). Class Heterolobosea. En: J.J. Lee, G.F. Leedale, & P. Bradbury (Eds.). *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Second edition. Society of Protozoologists, pp 1104-1111.

Puzon, G. J., Wylie, J. T., Walsh, T., Braun, K., & Morgan, M. J. (2017). Comparison of biofilm ecology supporting growth of individual *Naegleria* species in a drinking water distribution system. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(4).
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix017>

Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G. S., Sriram, R., & da Silva, A. J. (2006). Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3589–3595.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00875-06>

Qvarnstrom, Y., da Silva, A. J., Schuster, F. L., Gelman, B. B., & Visvesvara, G. S. (2009). Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(8), 1139–1142. <https://doi.org/10.1086/597473>

Retana-Moreira, L., Abrahams-Sandí, E., Cabello-Vílchez, A. M., Reyes-Batlle, M., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2014). Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* from combination shower units in Costa Rica. *Parasitology Research*, 113(11), 4117–4122.
<https://doi.org/10.1007/s00436-014-4083-6>

Retana-Moreira, L., Abrahams-Sandí, E., Castro-Artavia, E., Fernández-Sánchez, A., Castro-Castillo, A., Reyes-Batlle, M., & Lorenzo-Morales, J. (2015). Isolation and Molecular Characterization of *Acanthamoeba* Strains from Dental Units in Costa Rica. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(6), 733–736. <https://doi.org/10.1111/jeu.12229>

Retana Moreira, L., Zamora Rojas, L., Grijalba Murillo, M., Molina Castro, S. E., & Abrahams Sandí, E. (2020a). Primary amebic meningoencephalitis related to groundwater in Costa Rica: Diagnostic confirmation of three cases and environmental investigation. *Pathogens*, 9(8), 1–9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080629>

Retana Moreira, L., Ramírez, D. V., Linares, F., Ledezma, A. P., Garro, A. V., Osuna, A., Morales, J. L., & Sandí, E. A. (2020b). Isolation of *Acanthamoeba* T5 from water: Characterization of its pathogenic potential, including the production of extracellular vesicles. *Pathogens*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020144>

Retana Moreira, L., Steller Espinoza, M. F., Chacón Camacho, N., Cornet-Gomez, A., Sáenz-Arce, G., Osuna, A., & et al. (2022). Characterization of extracellular vesicles secreted by a clinical isolate of *Naegleria fowleri* and identification of immunogenic components within their protein cargo. *Biology*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/biology11070983>

Retana Moreira, L., Cornet-Gomez, A., Sepulveda, M. R., Molina-Castro, S., Alvarado-Ocampo, J., Chaves Monge, F., Jara Rojas, M., Osuna, A., & Abrahams Sandí, E. (2024). Providing an in vitro depiction of microglial cells challenged with immunostimulatory extracellular vesicles of *Naegleria fowleri*. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1346021>

Réveiller, F. L., Cabanes, P. A., & Marciano-Cabral, F. (2002). Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitology Research*, 88(5), 443–450. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0591-x>

Rivera, F., Ramirez, P., Vilaclara, G., Robles, E., & Medinat, F. (1983). A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environmental Research*, 32, 205–211. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(83\)90207-4](https://doi.org/10.1016/0013-9351(83)90207-4)

Rodriguez-Anaya, L. Z., Félix-Sastré, Á. J., Lares-Villa, F., Lares-Jiménez, L. F., & Gonzalez-Galaviz, J. R. (2021). Application of the omics sciences to the study of *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., and *Balamuthia mandrillaris*: Current status and future projections. *Parasite*, 28. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021033>

Rodríguez Mena, D., Retana-Moreira, L., & Abrahams-Sandí, E. (2017). *Acanthamoeba* genotype T4 keratitis in a patient with Thygesons superficial punctate keratitis. *Rev. Colegio de Microb. Quim. Clin.*, 23(1), 32–35.

Saberi, R., Seifi, Z., Dodangeh, S., Najafi, A., Abdollah Hosseini, S., Anvari, D., et al. (2020). A systematic literature review and meta-analysis on the global prevalence of *Naegleria* spp. in water sources. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 2389–2402. <https://doi.org/10.1111/tbed.13635>

Sarink, M. J., van der Meijjs, N. L., Denzer, K., Koenderman, L., Tielens, A. G. M., & van Hellemond, J. J. (2022). Three encephalitis-causing amoebae and their distinct interactions with the host. *Trends in Parasitology*, 38, 230–245. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.10.004>

Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34, 1001–1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>

Shibayama, M., Martínez-Castillo, M., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Navarro-García, F., Escobar-Herrera, J., et al. (2013). Disruption of MDCK cell tight junctions by the

free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*, 159(2), 392–401.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.063255-0>

Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2008). Balamuthia amoebic encephalitis: An emerging disease with fatal consequences. *Microbial Pathogenesis*, 44, 89–97.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.06.008>

Singh, P., Kochhar, R., Vashishta, R. K., Khandelwal, N., Prabhakar, S., Mohindra, S., et al. (2006). Amebic meningoencephalitis: Spectrum of imaging findings. *American Journal of Neuroradiology*, 27, 1217–1221. <https://www.ajnr.org>

Stahl, L. M., & Olson, J. B. (2021). Environmental abiotic and biotic factors affecting the distribution and abundance of *Naegleria fowleri*. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1), fiae238. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae238>

Stahl, L. M., & Olson, J. B. (2023). Investigating the interactive effects of temperature, pH, and salinity on *Naegleria fowleri* persistence. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 70(3), e12964. <https://doi.org/10.1111/jeu.12964>

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>

Visvesvara, G. S. (2013). Infections with free-living amebae. En: H. H. Garcia, H. B. Tanowitz, & O. H. del Brutto (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 112, pp. 1–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801893-4.00001-1>

Wagner, C., Dorta, A., Pérez, M., Galindo, M., Nessi, A., Vethencourt, M., Bandes, A., & Guzmán, C. (2011). *Acanthamoeba* spp found in a cerebral biopsy from a patient with metastatic adenocarcinoma. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"* 42(2), 56–59.

Yoder, J. S., Eddy, B. A., Visvesvara, G. S., Capewell, L., & Beach, M. J. (2010). The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiology and Infection*, 138(7), 968–975. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991014>

Yousuf, F. A., Siddiqui, R., Subhani, F., & Khan, N. A. (2013). Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. *Journal of Water and Health*, 11(2), 371–375. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.112>

A continuación, se presentan dos manuscritos que abordan la temática general de esta tesis. En cada uno se desarrolla una metodología alineada a un objetivo claro que pretende responder el problema planteado, introducido y justificado en esta sección.

ARTÍCULO I

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y GEOAMBIENTAL DE CUERPOS DE AGUA
DULCE CON CAPACIDAD PARA ALBERGAR Y FAVORECER LA PRESENCIA
AMEBAS DE VIDA LIBRE POTENCIALMENTE PATÓGENAS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E GEOAMBIENTAL DE CORPOS DE ÁGUA
DOCE COM CAPACIDADE PARA ABRIGAR E FAVORECER A PRESENÇA DE
AMEBAS DE VIDA LIVRE POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS

PHYSICOCHEMICAL AND GEOENVIRONMENTAL CHARACTERIZATION OF
FRESHWATER BODIES WITH CAPACITY TO HOST AND PROMOTE THE PRESENCE
OF POTENTIALLY PATHOGENIC FREE-LIVING AMOEBAE

Este artículo se someterá a la Revista de Salud Ambiental, órgano de la Sociedad Española de Salud Ambiental, Sociedade Portuguesa de Saúde Ambiental y de la Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental (<https://salud-ambiental.com/revista/>). Ver Anexo 1.

RESUMEN

Dentro del grupo de las amebas de vida libre (AVL), el género *Naegleria* destaca por incluir especies adaptadas a temperaturas por encima de los 40 °C como la ameba facultativa *N. fowleri*, causante de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). *Naegleria* spp. se pueden encontrar en entornos terrestres y acuáticos variados, entrando así en contacto con el ser humano fácilmente. La caracterización y evaluación de cuerpos de agua es fundamental para conocer la presencia de microorganismos patógenos y el riesgo de

infección. En este estudio se realizó una encuesta de condiciones ambientales para la identificación de parámetros fisicoquímicos y geospaciales relacionados con la presencia de *N. fowleri* en fuentes de agua dulce naturales utilizadas para la visitación turística y recreativa en Costa Rica durante 2023. Se muestreó agua y sedimentos de 24 lugares y se midieron parámetros como temperatura, pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto en agua. Del agua, además, se realizó cultivo, aislamiento y pruebas moleculares, resultando siete de los sitios positivos por *Naegleria* (29,2 %) pero todos negativos por *N. fowleri*. En el sedimento se realizaron determinaciones de metales, cationes y análisis de textura. Hubo asociación estadística significativa ($p < 0,05$) entre el oxígeno disuelto, la conductividad del agua, el cobre y el porcentaje de arcilla en sedimento con la presencia de *Naegleria* spp., aunque la asociación epidemiológica no lo fue. Los sitios presentaron un predominio de cobertura forestal y se ubicaron en regiones subclimáticas con patrones de lluvia importantes. Este trabajo representa un primer monitoreo para determinar la presencia de AVL potencialmente patógenas en aguas superficiales de Costa Rica.

RESUMO

Dentro do grupo das amebas de vida livre (AVL), o gênero *Naegleria* se destaca por incluir espécies adaptadas a altas temperaturas, como a ameba facultativa *N. fowleri*, causadora da meningoencefalite amebiana primária (MAP). *Naegleria* spp. pode ser encontrada em diversos ambientes terrestres e aquáticos, entrando facilmente em contato com os seres humanos. A caracterização e avaliação de corpos d'água são fundamentais para identificar a presença de microrganismos patogênicos e o risco de infecção. Este estudo propôs uma pesquisa ambiental para a identificação de parâmetros físico-químicos e geospaciais relacionados à presença de *N. fowleri* em fontes naturais de água doce utilizadas para turismo e recreação na Costa Rica durante 2023. Amostras de água e sedimentos foram coletadas em 24 locais, e foram medidos parâmetros como temperatura,

pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido na água. Além disso, amostras de água foram cultivadas, isoladas e submetidas a testes moleculares, revelando que sete locais (29,2 %) testaram positivo para *Naegleria*, mas todos foram negativos para *N. fowleri*. Nas amostras de sedimentos, foram realizadas análises de metais, cátions e textura. Hubo uma associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o oxigênio dissolvido, a condutividade da água, o cobre e a porcentagem de argila no sedimento com a presença de *Naegleria* spp., embora a associação epidemiológica não tenha sido significativa. Os locais apresentaram predominantemente cobertura florestal e estavam situados em regiões subclimáticas com padrões de precipitação significativos. Este estudo representa um primeiro monitoramento para determinar a frequência de AVL potencialmente patogênicas em águas superficiais da Costa Rica.

ABSTRACT

Within the group of free-living amoebae (FLA), the genus *Naegleria* stands out for including species adapted to high temperatures, such as the facultative amoeba *N. fowleri*, the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis (PAM). *Naegleria* spp. can be found in various terrestrial and aquatic environments, easily coming into contact with humans. Characterizing and assessing water bodies is essential to determine the presence of pathogenic microorganisms and the risk of infection. This study proposed an environmental survey to identify physicochemical and geospatial parameters related to the presence of *N. fowleri* in natural freshwater sources used for tourism and recreation in Costa Rica during 2023. Water and sediment samples were collected from 24 locations, and parameters such as temperature, pH, electrical conductivity, and dissolved oxygen in water were measured. Additionally, water samples were cultured, isolated, and subjected to molecular tests, revealing that seven sites (29,2 %) tested positive for *Naegleria*, but all were negative for *N. fowleri*. In sediment samples, metal, cation, and texture analyses were

performed. Although dissolved oxygen, water conductivity, copper concentration, and clay percentage in sediment were statistically associated ($p < 0,05$) with the presence of *Naegleria* spp., epidemiological association was not demonstrated. The sites predominantly featured forest cover and were located in subclimatic regions with significant rainfall patterns. This study represents an initial monitoring effort to determine the frequency of potentially pathogenic AVL in surface waters of Costa Rica.

PALABRAS CLAVE / PALAVRAS-CHAVE / KEYWORDS

Naegleria; agua dulce; sedimento; fisicoquímico; textura; uso de suelo

Naegleria; água doce; sedimento; físico-químico; textura; uso do solo

Naegleria; freshwater; sediment; physicochemical; texture; land use

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza y algunas de ellas son consideradas anfizoicas, pues también pueden establecerse y provocar infecciones (del sistema nervioso central, oculares o dérmicas, entre otras) en el ser humano, bajo determinadas circunstancias ^{1,2}. Las principales AVL con potencial patógeno son de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia* y *Balamuthia* ³. Dada su ubicuidad, pueden habitar entornos acuáticos como ríos y lagos, que constituyen una potencial fuente para personas que se vean inmersas en estos sitios ^{4,5}. *Naegleria fowleri*, de la familia Vahlkampfiidae (VAHL), destaca por lo fulminante de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) que provoca ⁶. Si bien *Naegleria fowleri* es un microorganismo adaptado a la vida acuática, se cree que el paso del agua proveniente de nacientes por la tierra y el suelo conduce a la llegada de la ameba a piscinas y otros cuerpos de agua ⁷.

Debido a la contribución del ambiente a la carga de enfermedad, un sistema de vigilancia ambiental para conocer la distribución, abundancia y frecuencia de *N. fowleri* y otras AVL en entornos acuáticos es necesario. Un metaanálisis con información de 35 países arrojó una prevalencia global de *Naegleria* spp. y *N. fowleri* de 26,4 % y 23,3 % en diferentes fuentes de agua, respectivamente ⁸. La caracterización de los elementos del entorno y su rol en el camino causal con un fenómeno permite dilucidar la exposición en el marco de la epidemiología ambiental, así como redirigir la mirada al entendimiento de la exposición y no tanto al efecto da visibilidad al contexto de las condiciones que determinan los eventos ⁹.

Algunos investigadores han propuesto el desarrollo de encuestas para conocer y monitorear la presencia de *N. fowleri* en aguas superficiales de regiones que se han visto afectadas por casos de MAP ^{10,11}. Las encuestas de condiciones ambientales se han hecho en varias fuentes de agua modificadas por el ser humano como tuberías, piscinas artificiales o pozos, en donde se ha encontrado AVL potencialmente patógenas sin hallazgos de *N. fowleri* ¹²⁻¹⁶. También se ha obtenido resultados negativos para *N. fowleri* en cuerpos de agua naturales, pero con presencia importante de otras especies de *Naegleria* ¹⁷⁻²¹. No obstante, ha sido posible corroborar la presencia de la ameba patógena en ríos de ciudades importantes como El Cairo (Egipto) (mayor prevalencia en verano y primavera) ²² y Daejeon (Corea) ²³, en pozas en India ²⁴, así como en lagos ²⁵⁻²⁷ y aguas asociadas a centros de recreación, tales como piscinas, aguas termales, ríos, pozas y lagos en complejos turísticos ^{28,29}. En muchos trabajos destacados de este tipo han incluido la determinación de parámetros de otra índole en el entorno (bióticos y abióticos), con el fin de correlacionar con el hallazgo de la ameba y proveer información de mayor alcance para comprender el fenómeno ^{1,30}.

Durante los muestreos de agua o sedimentos de ríos o lagos, se han hecho mediciones de temperatura, pH, conductividad eléctrica, turbidez y concentración de oxígeno disuelto en agua. Aunque en muchos casos no se ha logrado establecer una relación entre dichas determinaciones y la presencia de *N. fowleri*^{23,26,27} (incluso realizadas en acuíferos subterráneos positivos)²⁸, hay estudios que sí reflejan correlaciones positivas con la temperatura^{31,32}. La ameba se ha logrado aislar de aguas con temperaturas que van desde los 20.84 °C³³, hasta los 47 °C³⁴, y también ha sido posible el aislamiento en épocas de descenso en la temperatura atmosférica con conteos de hasta 201 NMP/l^{27,28}. Además, otros estudios han encontrado relaciones positivas entre la presencia a la ameba y mediciones de oxígeno disuelto en agua de lagos²⁵ y turbidez en aguas geotérmicas recreacionales, lo que podría asociarse con la presencia de sedimento resuspendido²⁹.

Por otro lado, se ha propuesto el rol de algunos compuestos como favorecedores del desarrollo de la ameba. Por ejemplo, la adición de hierro exógeno al medio de cultivo ha favorecido su viabilidad y crecimiento, mientras agentes quelantes de este metal producen un efecto inhibitorio^{35,36}. El manganeso también se ha estudiado como posible elemento favorable para el crecimiento de la ameba³⁷. Otros elementos probados como potenciales predictores de la presencia de *N. fowleri* en aguas recreacionales, con resultados altamente variables y correlaciones negativas, han sido los iones potasio, calcio, magnesio, sulfato, cloruro, sodio, amonio, nitrato, bicarbonato (K, Ca, Mg, SO₄, Cl, Na, SiO₂, NH₄, NO₃, HCO₃), carbono total y dióxido de silicio²⁹.

Las características del suelo, del tiempo atmosférico, y las actividades humanas, que necesariamente están asociadas a la geomorfología y ubicación de los lugares, pueden incidir en la posibilidad de encontrar *N. fowleri*, como es el caso del hallazgo de cantidades de *N. fowleri* significativamente más altas en verano con respecto al invierno³². En 1985, Kyle & Noblet²⁵ reportaron AVL en capas de arcilla tras el arrastre de material posterior a

días lluviosos. El cambio en los patrones de uso y cobertura de suelo determina, en muchas ocasiones, las modificaciones en el entorno con impacto en cuencas hidrográficas y la diversidad asociada a ellas. En el caso de los cuerpos de agua dulce que son importantes repositorios de biodiversidad y recursos naturales, se conoce del riesgo que les supone la expansión urbana y agrícola en términos de contaminación y degradación del entorno ^{38,39}. El uso de datos espaciales sobre cobertura de bosques, pastos, cultivos, áreas montañosas y urbanas es útil para la evaluación y proyección del impacto de estos estresores ambientales ⁴⁰.

Contemplar distintos tipos de cuerpo de agua en un diseño metodológico también ha permitido establecer diferencias en las frecuencias de la ameba en función de esta variable ²⁹. Aunado a esto, Detterline & Wilhelm (1991) correlacionaron la ocurrencia del patógeno con perturbaciones naturales o antropogénicas (como canales o embalses) del entorno al provocar el aclaramiento de la biota por el sometimiento a estresores ambientales ⁴¹. Finalmente, la textura de los sedimentos, que es la composición relativa de partículas de diferente tamaño en términos de arena, limo y arcilla, indica la procedencia y porosidad ⁴², pero también correlaciona con la actividad microbiana ⁴³.

En línea con las ideas expuestas, en este trabajo se propone identificar parámetros fisicoquímicos y características geoespaciales relacionadas con la presencia de *Naegleria fowleri* en diferentes fuentes de agua dulce naturales utilizadas para la visitación turística y recreativa en las regiones Chorotega, Huetar Norte y Huetar Caribe de Costa Rica durante 2023.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

Se planteó una encuesta de vigilancia ambiental enmarcada en un estudio de tipo transversal descriptivo y analítico para estudiar cuerpos naturales de agua dulce ubicados en las regiones Chorotega, Huetar Norte y Huetar Caribe (Figura 1). En estos lugares se encuentran las fuentes de agua con las que se estableció el nexo epidemiológico en los casos de MAP en Costa Rica ^{44,45}. Según Solano Quintero & Villalobos Flores (2001) ⁴⁶, así como en los Planes de Acción Regional para la Adaptación al Cambio Climático del MINAE ⁴⁷⁻⁴⁹, la región Chorotega posee áreas de clima templado y otras de clima tropical seco, con temperaturas que oscilan entre los 21 °C y 36 °C, en tanto que las regiones Huetar Norte y Huetar Caribe exhiben un clima tropical húmedo y temperaturas medias de 26 °C y 27 °C a 30 °C, respectivamente.

Se definió un marco muestral mínimo de veinte sitios para realizar un muestreo por conveniencia (no probabilístico), identificando los cuerpos de agua a partir de la consulta a las Cámaras de Turismo de las regiones de interés, y que fueran reconocidos como destinos turísticos de acceso público, gratuito o administrado por una Asociación de Desarrollo Comunal, cuya topografía permitiera el ingreso. Se visitó la totalidad de los sitios de muestreo identificados y se amplió su número por medio de la técnica de bola de nieve ⁵⁰, ubicando sitios aledaños que cumplieran con los criterios de selección anteriormente expuestos, llegando a veinticuatro en total. Todos los sitios de muestreo se georreferenciaron por medio de la aplicación móvil con sistema de posicionamiento global TcpGPS (Aplitop - Surveying & Civil Engineering Solutions, España). ⁵¹.

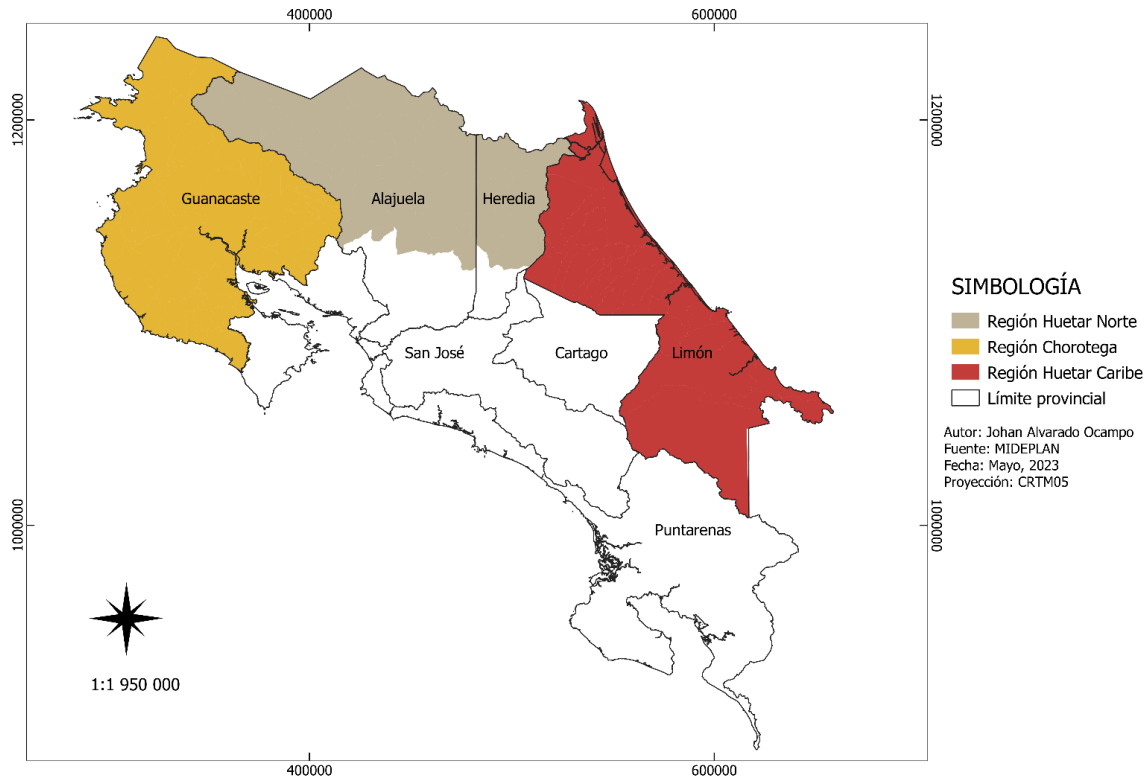


Figura 1. Mapa de Costa Rica, indicando las regiones que constituyeron las áreas de estudio. Elaboración propia.

En cada cuerpo de agua se tomaron cuatro submuestras de agua que posteriormente conformaron una única muestra compuesta representativa del lugar. Se muestreó sedimento de la misma forma. A continuación, se detalla para cada caso:

- Las muestras de agua se recolectaron según los procedimientos de “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2017”⁵² con algunas adaptaciones de la metodología de Lares Villa et al.²⁸: a una profundidad de 30 cm, se removió el sedimento y se dejó asentar, para luego tomar la muestra utilizando bolsas estériles de 450 mL (LABPLAS Inc., Canada). El transporte y almacenamiento de las muestras se realizó a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio.

- Con base en “Sediment Sampling Guide and Methodologies 2001”⁵³, se recolectó sedimento (0-10 cm de profundidad) que se almacenó en 4 tubos plásticos estériles de 50 mL (Boeckel & Co. GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany); uno de ellos se conservó a - 20 °C para el análisis molecular.

Aislamiento e identificación de AVL

Se siguió el procedimiento descrito por Retana Moreira et al.⁴⁵ con algunas modificaciones. Brevemente:

Cultivo de muestras: el volumen final total de cada muestra de agua compuesta (1,8 L) se filtró a través de membranas de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm (Merck-KGaA, Darmstadt, Germany) y el filtro se colocó en placas de agar no nutritivo 1,5 % suplementado con *Escherichia coli*. Las placas se incubaron a 42 °C por al menos 7 días y las amebas que crecieron fueron subcultivadas transfiriendo una pequeña cantidad del cultivo a un nuevo medio de cultivo para seleccionarlas y propagarlas. Las placas con crecimiento se lavaron con 1,0 mL de PBS estéril frío, se transfirió el material lavado a tubos Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se descartó y el sedimento se utilizó para las pruebas moleculares.

Extracción de ADN: a partir del sedimento resultante del paso anterior se siguieron las instrucciones del fabricante del kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Los productos se cuantificaron mediante el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y se almacenaron a - 20 °C.

Amplificación por PCR y secuenciación: se amplificó la región ITS completa (ITS1, ITS2 y 5.8S) según De Jonckheere & Brown (2005)⁵⁴, para lo cual se utilizaron los primers específicos para el género *Naegleria* (ITSFW: 5´-AACCTGCGTAGGGATCATTT-3´ y ITSrv 5´- TTTCTCCCCTTATTAATAT-3´) y específicos de *Naegleria fowleri* (NfITSFW

5'-TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA-3' y NfITSRV 5'-AATAAAAGATTGACCATTTGAAA-3'). Se siguió el protocolo de PCR y electroforesis descrito por Retana Moreira et al. ⁴⁵. Los controles negativos (reemplazo del ADN con agua destilada), positivos (ADN de la cepa de *N. fowleri* Lee ATCC 30808) y el ADN de las muestras se analizaron utilizando los dos sets de primers.

Medición de parámetros fisicoquímicos

En el sitio de muestreo se utilizó un medidor multiparámetro YIERYI C-600 (Shen Zhen Yage Technology Co., China) para determinar temperatura, sólidos disueltos, pH y conductividad eléctrica. Asimismo, se midió la concentración de oxígeno disuelto a través del analizador YIERYI JPB-70A (Shen Zhen Yage Technology Co., China). En el caso del sedimento, se realizaron análisis químicos (calcio, magnesio, potasio, fósforo, cobre, hierro, zinc, manganeso, carbono y nitrógeno), de pH, conductividad eléctrica y textura en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la UCR. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, exceptuando el ensayo de textura del sedimento.

Procesamiento de datos espaciales

Se utilizó el software QGIS 3.30.3 ⁵⁵ para identificar la subregión climática a la que pertenecen los sitios de muestreo georreferenciados, según Solano Quintero & Villalobos Flores (2001) ⁴⁶. Asimismo, se creó un área de influencia alrededor de cada punto de muestreo equivalente al doble de la zona de protección para ríos y quebradas en zona rural según la Ley Forestal N.º 7575 ⁵⁶ que es de 15 m; es decir, se trabajó con un radio de 30 m, con el fin de dar margen al espacio geográfico en que las personas se pueden desplazar. Dentro del área de influencia se calculó el porcentaje de territorio destinado a distintas clasificaciones de uso de suelo (cobertura forestal, cultivos, pastos y edificaciones).

Análisis estadístico-epidemiológico

Se realizaron análisis univariados y bivariados, con un nivel de significancia estadística $\alpha = 0,05$. La presencia de *N. fowleri* en los sitios muestreados constituyó la variable dependiente, mientras que las variables independientes fueron los resultados de las determinaciones fisicoquímicas en agua y sedimento, así como las características geoespaciales.

Las medidas de tendencia central y dispersión a utilizar para las variables cuantitativas se determinaron según la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, siendo la media y desviación estándar para aquellas de distribución normal, o mediana y rango intercuartílico cuando la distribución era no paramétrica. La misma prueba de normalidad ayudó a definir el uso de estadísticas de inferencia bivariada, como la prueba t (paramétrica) o de Wilcoxon (no paramétrica) para comparar la medida de tendencia central entre grupos definidos por la variable dependiente. La prueba de Exacta de Fisher también se utilizó para comparar proporciones de las variables categóricas (región, subregión climática y clase textural) y la variable dependiente.

En búsqueda de un modelo de relaciones explicativas para la variable dependiente, se planteó una regresión logística no condicional, multivariada, de la que se obtuvieron razones de posibilidad u odds ratio (OR, por sus siglas en inglés) y sus respectivos intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %). Se hizo un análisis estratificado por región y subregión climática. Las variables candidatas a integrar el modelo por el método paso a paso se eligieron acorde con la evidencia científica y el criterio de Hosmer-Lemeshow ($p < 0,25$)⁵⁷ posterior al análisis bivariado. El modelo de mejor ajuste se seleccionó de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés)⁵⁸.

Todos los análisis descritos se ejecutaron en el paquete estadístico STATA® v. 14 (Stata Corp LLC, TX, USA)⁵⁹.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de AVL

Se muestrearon 24 cuerpos de agua, en el periodo comprendido entre julio y noviembre de 2023 dentro de las regiones subclimáticas descritas en el Cuadro 1. Se recolectaron 96 submuestras de agua, de las cuales 56 (provenientes de 22 de los sitios de muestreo) presentaron aislamiento positivo a 42 °C. Se seleccionaron y subcultivaron los diferentes morfotipos de cada sitio para ser identificados por métodos moleculares.

La PCR a nivel de género *Naegleria* detectó 11 muestras positivas, provenientes de siete sitios de muestreo (cinco de la Región Huetar Norte, uno de la Región Chorotega y uno de la Región Huetar Caribe), como se muestra en las Figuras 2 y 3, para una frecuencia relativa de 29,2 % (7/24) [IC 95 %: 11,0-47,4]. La PCR de especie *N. fowleri* no amplificó para ninguna de las muestras. Sin embargo, se planteó el análisis propuesto con base en la positividad de los sitios por *Naegleria* (género taxonómico) como una aproximación a la presencia de AVL potencialmente patógenas.

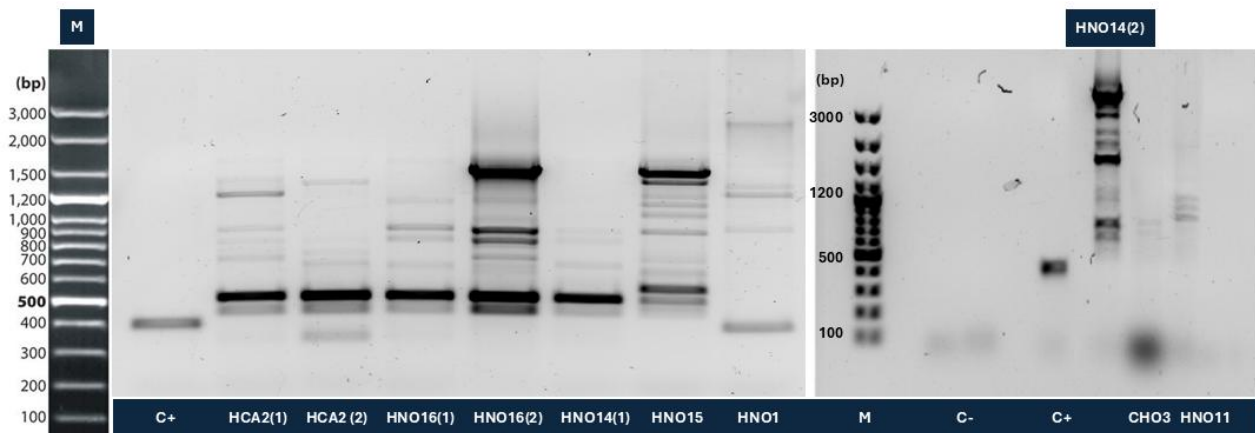


Figura 2. Identificación molecular de *Naegleria* (región ITS) en submuestras de agua. M: marcador de peso molecular en pares de bases (bp); C+: control positivo (ADN de *N. fowleri*); C-: control negativo.

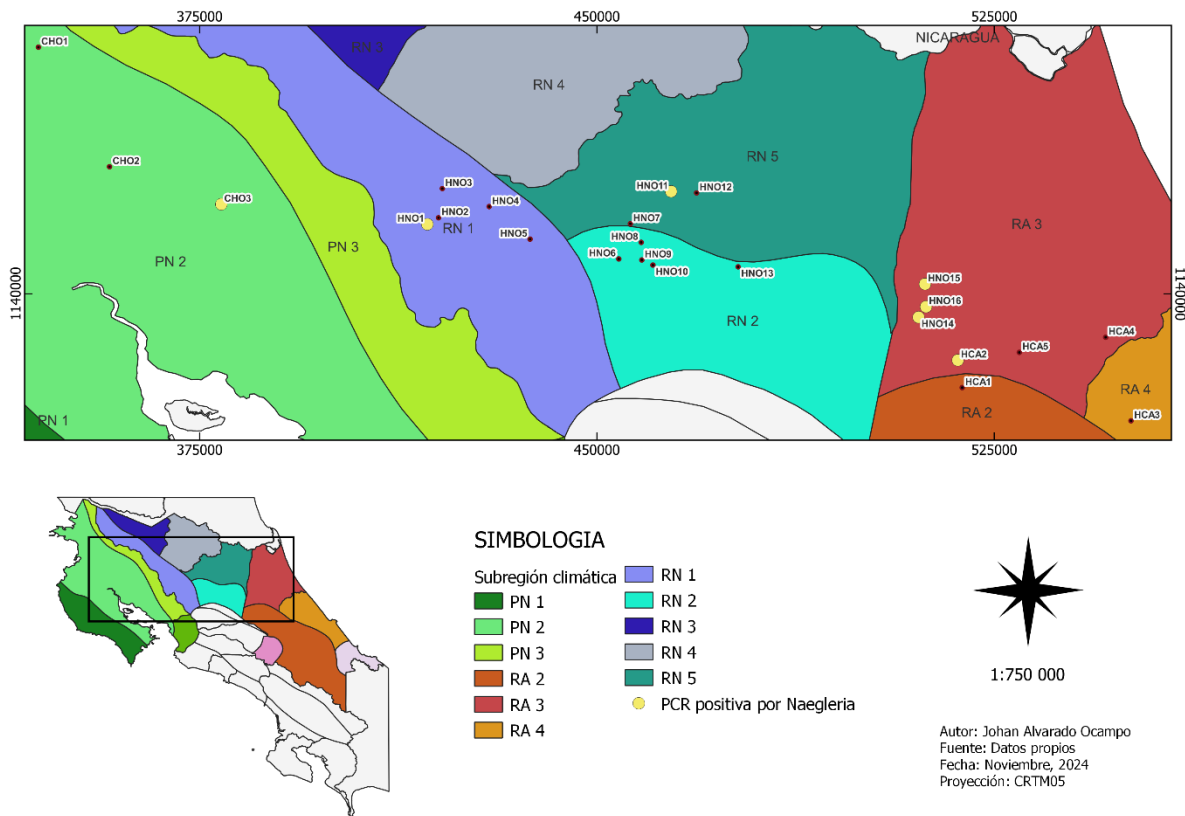


Figura 3. Sitios de muestreo con el detalle de aquellos en los que se aislaron AVL cuya identificación por PCR coincidió con *Naegleria*. Los puntos se muestran sobre una capa de coropletas de subregiones climáticas brindada por el Instituto Meteorológico Nacional. De las muestras de agua tomadas en todos estos puntos, solamente en HCA1 y HNO2 no hubo aislamiento de AVL a 42 °C. El método de PCR detectó material genético de *Naegleria* en las subregiones climáticas PN2 (1), RN5 (1), RA3 (4) y RN1 (1). PN: Pacífico Norte, RN: Región Norte, RA: Región Atlántica. Elaboración propia.

Caracterización fisicoquímica de agua y sedimento de los cuerpos de agua dulce

Las mediciones en agua y sedimento de cada cuerpo de agua visitado se detallan en el Cuadro 2. Además, la clasificación de los sedimentos por clase textural se desagrega en el Cuadro 3. Solamente los conjuntos de datos del oxígeno disuelto y la medición de fósforo siguieron una distribución normal, de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre las variables categóricas y la presencia de *Naegleria* spp. ($p > 0,05$); lo mismo al probar las variables

cuantitativas, con excepción de la conductividad eléctrica y el oxígeno disuelto en agua, así como la determinación de cobre y el porcentaje de arcilla en el sedimento.

Cuadro 1. Caracterización de regiones subclimática donde se encontraron los lugares con positividad molecular por *Naegleria*, de acuerdo con el Instituto Meteorológico Nacional.

Subregión	Temperatura media anual (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Precipitación media anual (mm)	Promedio de días con lluvia	Formación forestal	Tipo de clima
PN2	25-30	23	30	1800	99	Bosque tropical seco	De sequía
RN5	26	21	31	3710	193	Bosque tropical húmedo	Excesivo en lluvias del Atlántico. Sin periodo seco.
RA3	25	20	30	4860	226	Bosque tropical húmedo	Excesivo en lluvias del Atlántico. Sin periodo seco.
RN1	25	21	30	3100	225	Bosque subtropical muy húmedo	Lluvioso con influencia monzónica. Sin periodo seco.

Fuente: Solano Quintero & Villalobos Flores (2001) ⁴⁶

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos medidos en agua y sedimento de los sitios de muestreo, según su positividad (POS)/negatividad (NEG) molecular por *Naegleria* y en total.

Parámetro fisicoquímico	Unidad	POS (n=7)		NEG (n=17)		Total (n=24)	
		Media (DE)	Mediana (RIC)	Media (DE)	Mediana (RIC)	Media (DE)	Mediana (RIC)
Matriz: agua							
Temperatura	°C	25,0 (2,0)	25,4 (3,4)	26,0 (3,6)	24,1 (4,1)	25,7 (3,3)	25,0 (3,8)
Solutos disueltos	ppm	34,3 (12,3)	28,0 (25,0)	121,1 (198,3)	51,0 (74,3)	95,8 (170,4)	44,2 (26,8)
Conductividad eléctrica **	µS/cm	69,0 (24,1)	56,0 (49,3)	233,7 (372,3)	102,7 (149,3)	185,6 (320,0)	93,3 (54,4)
Oxígeno disuelto *	mg/dl	12,5 (1,4)	13,1 (2,4)	11,3 (1,2)	11,4 (1,3)	11,7 (1,4)	11,7 (1,8)
pH		7,1 (0,4)	7,0 (0,9)	6,8 (0,3)	6,7 (0,2)	6,8 (0,4)	6,7 (0,4)
Matriz: sedimento							
pH		6,8 (0,4)	6,7 (0,2)	6,8 (0,9)	7,0 (0,5)	6,8 (0,8)	6,8 (0,6)
Ca	cmol(+)/l	5,5 (2,7)	4,5 (3,1)	5,8 (3,8)	5,3 (2,1)	5,7 (3,4)	5,3 (2,1)
Mg		2,3 (1,0)	2,1 (0,9)	2,8 (2,9)	1,8 (1,5)	2,7 (2,5)	2,0 (1,4)
K		0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,4 (0,2)	0,3 (0,3)	0,4 (0,2)	0,3 (0,2)
P		3,3 (1,1)	3,0 (2,0)	3,7 (1,7)	3,0 (3,0)	3,6 (1,5)	3,0 (3,0)
Zn	mg/l	1,1 (1,0)	1,0 (1,6)	2,1 (1,7)	1,9 (2,3)	1,8 (1,6)	1,2 (2,4)
Cu **		1,4 (1,3)	1,0 (3,0)	3,6 (3,1)	3,0 (1,6)	2,9 (2,9)	2,5 (2,0)
Fe		29,1 (17,4)	21,0 (33,0)	51,7 (62,4)	32,0 (49,0)	45,6 (53,8)	32,0 (38,8)
Mn		6,4 (4,9)	5,0 (10,0)	14,2 (26,5)	6,0 (9,0)	11,9 (22,5)	6,0 (8,2)
Conductividad eléctrica	mS/cm	0,1 (0,0)	0,10 (0,0)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,1 (0,0)
Arena	%	93,7 (2,4)	95,0 (3,0)	87,1 (12,4)	91,0 (4,9)	89,0 (10,9)	92,0 (5,0)
Limo		4,7 (1,2)	5,0 (3,0)	6,7 (5,7)	4,0 (5,0)	6,1 (4,9)	5,0 (3,8)
Arcilla **		1,6 (1,8)	2,0 (2,0)	6,2 (8,0)	5,0 (4,0)	4,8 (7,1)	2,0 (3,8)

DE: desviación estándar, RIC: rango intercuartil

* T-test (p < 0,05), la diferencia de las medias es estadísticamente significativa. ** Suma de Rangos de Wilcoxon (p < 0,05), la diferencia de las medianas es estadísticamente significativa.

Cuadro 3. Clasificación de sedimentos muestreados según el tipo de textura y la positividad (POS)/negatividad (NEG) molecular del sitio por *Naegleria*.

Clase textural	POS (n=7)	NEG (n=17)	Total (n=24)
Arenoso	7	13	20
Arena Franca	0	2	2
Franco Arenoso	0	1	1
Franco Arcilloso	0	1	1

Porcentaje de uso de suelo alrededor de los puntos de muestreo georreferenciados

La cobertura de bosques fue la predominante (Figura 4). Solamente en una locación (HCA5) se encontraron edificaciones en menos del 0,1 % del área de influencia, mientras que en dos (HN07 y HNO11) se encontró un 29,7 y 0,004 % de cobertura de cultivos. En 13 sitios hubo pastos dentro del área de influencia, con un promedio de 18,1 % del área de influencia. En el sitio HNO7 no se encontró cobertura forestal, pero en los restantes 23 puntos de muestreo sí, con un promedio de cobertura del 58,0 % (rango: 15,1 – 100,0 %).

El porcentaje de cobertura forestal siguió una distribución normal de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), pero no se vio estadísticamente relacionada a la presencia de *Naegleria* spp.

Modelo de regresión logístico multivariado

Con las variables en estudio, bajo las características de este trabajo, no se consiguió un modelo epidemiológico con el ajuste estadístico idóneo para definir factores que se puedan interpretar, por medio de OR, como de mayor o menor influencia en la posibilidad de presencia de *Naegleria* spp. en cuerpos de agua dulce (Cuadro 4).

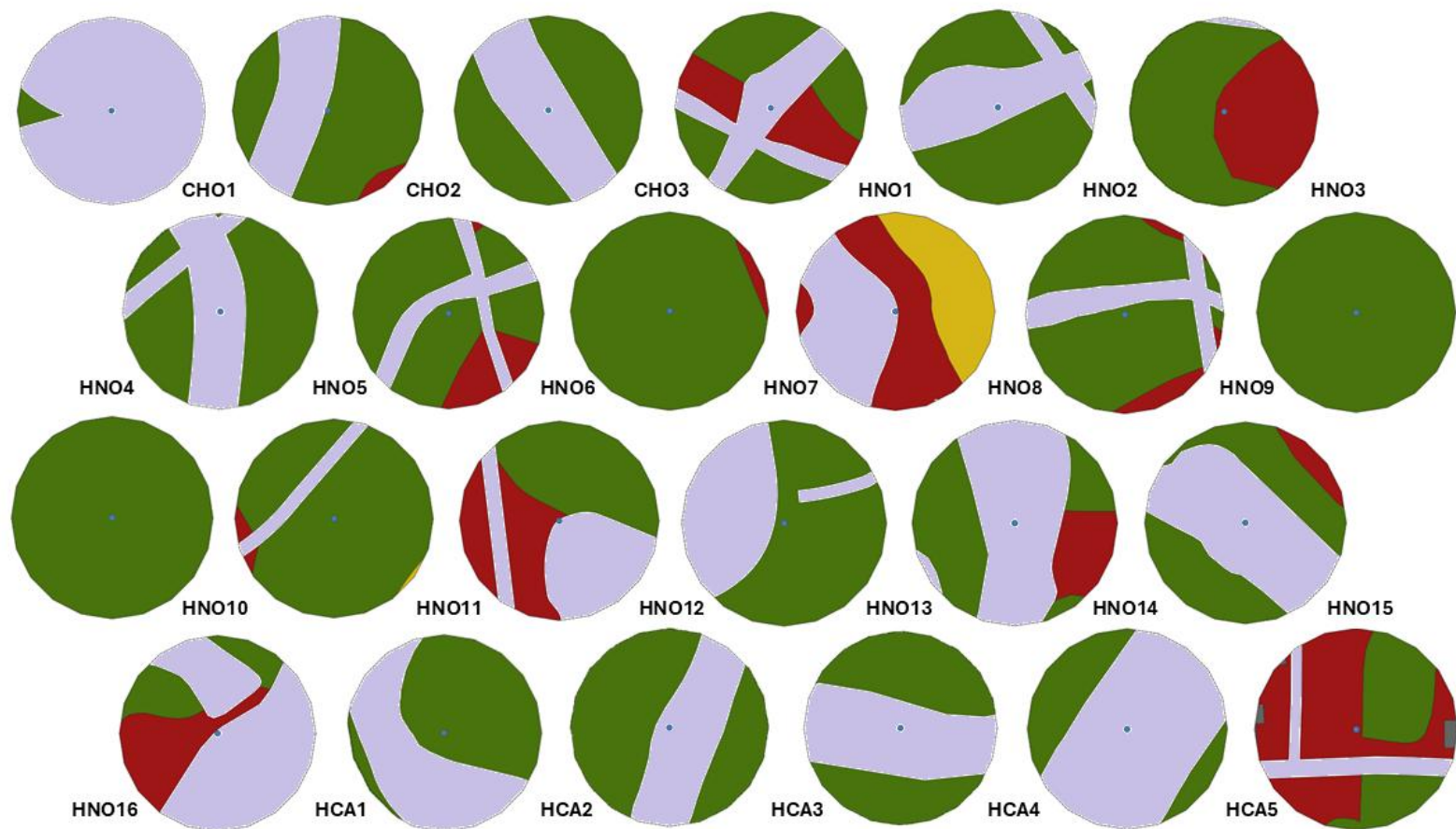


Figura 4. Área de influencia (2826 m²) de los sitios muestreados y representación de la cobertura de uso de suelo dentro de cada una: bosque (verde), pastos (rojo), cultivos (amarillo) y edificaciones (gris). El color lavanda a otros usos de suelo, como vías terrestres o el cauce de los cuerpos de agua. Elaboración propia.

Cuadro 4. Medida de asociación (OR) cruda entre las variables independientes y la presencia de *Naegleria*. en los cuerpos de agua dulce.

Variable independiente		OR	p	IC 95 %	
				Límite inferior	Límite superior
Categorías (geospaciales)					
Región	Chorotega	Ref.			
	Huetar Caribe	0,50	0,676	0,02	12,90
	Huetar Norte	0,91	0,943	0,06	12,52
Subregión climática	PN2	Ref.			
	RA2	1,00	-	-	-
	RA3	4,00	0,355	0,21	75,69
	RA4	1,00	-	-	-
	RN1	0,50	0,676	0,02	12,90
	RN2	1,00	-	-	-
	RN5	1,00	0,571	0,04	5,51
Numéricas (geospaciales)					
% Cobertura forestal		0,98	0,244	0,94	1,02
% Cobertura de edificaciones		1,00	-	-	-
% Cobertura de pastos		0,99	0,852	0,93	1,06
% Cobertura de cultivos		0,75	0,937	0,001	992,40
Numéricas (matriz: agua)					
Temperatura (°C)		0,89	0,486	0,65	1,22
pH		8,49	0,104	0,65	111,60
Solutos disueltos (ppm)		0,95	0,178	0,89	1,02
Conductividad eléctrica (µS/cm)		0,98	0,167	0,94	1,01
Oxígeno disuelto (mg/dl)		2,31	0,060	0,96	5,53
Numéricas (matriz: sedimento)					
pH		0,95	0,930	0,31	2,90
Ca (cmol(+)/l)		0,97	0,836	0,74	1,28
Mg (cmol(+)/l)		0,88	0,630	0,53	1,47
K (cmol(+)/l)		0,00002	0,088	1,3x10 ⁻⁸	3,54
P (cmol(+)/l)		0,82	0,527	0,44	1,52
Zn (mg/l)		0,58	0,188	0,26	1,31
Cu (mg/l)		0,42	0,062	0,17	1,04
Fe (mg/l)		0,98	0,359	0,94	1,02
Mn (mg/l)		0,94	0,512	0,78	1,13
Conductividad eléctrica (mS/cm)		0,0002	0,257	1,1x10 ⁻¹⁰	454,30
% Arena		1,35	0,140	0,91	2,01
% Limo		0,88	0,387	0,66	1,17
% Arcilla		0,60	0,080	0,34	1,06

DISCUSIÓN

Las AVL son microorganismos ubicuos en la naturaleza, presentes en gran variedad de entornos acuáticos y terrestres ^{1,2}. En este trabajo se logró el aislamiento de AVL capaces de proliferar a 42 °C a partir de muestras de agua de 22 sitios distribuidos en las Regiones Chorotega, Huetar Norte y Huetar Caribe de Costa Rica. Además, por PCR convencional se determinó que siete de estos sitios fueron positivos para la presencia de *Naegleria* spp., aunque no hubo amplificación con primers específicos para *N. fowleri*. Esta reacción de PCR específica, según hallazgos de nuestro grupo de investigación requiere de ADN de un número considerable de trofozoítos (resultados sin publicar), por lo que es importante considerar una posible baja cantidad de amebas tanto en las muestras tomadas como tras el proceso de selección por cultivo.

El grupo de las AVL es amplio en diversidad, adaptabilidad y distribución y, de no contar con *N. fowleri* como la especie predominante, es posible el “enmascaramiento” de su presencia. Además, se ha descrito que el principal reservorio para estos microorganismos son los suelos y sedimentos ^{7,60}, por lo que, aunque el método implica remover sedimento, puede haber un efecto de disminución de la concentración de amebas al resuspenderse en el agua.

La competencia que experimentan las AVL en sus nichos ecológicos, que la convierten en presa de otras AVL u otros protistas y hongos ^{30,61}, es un aspecto relevante por considerar. De hecho, Griffin 1983 planteó la hipótesis sobre el “hábitat vacío del flagelado”, en la que postula que *N. fowleri* se ve beneficiada en ambientes con escasos competidores ecológicos y predadores, dado que, a través de su forma flagelada, se puede trasladar hacia estos espacios y fácilmente colonizarlos y proliferar en ellos ¹. Particularmente, se ha descrito que AVL como *Balamuthia mandrillaris* y *Willaertia magna* exhiben comportamiento predatorio sobre *Naegleria* spp. ^{62,63}.

La competencia para *N. fowleri* no solo se relaciona con el fenómeno de predación, sino que puede darse una competencia por recursos limitados con otras AVL como *N. gruberi*, *N. lovaniensis* y otros eucariotas termotolerantes, que pueden poner en riesgo la ventaja ecológica que posee el patógeno y cambiar la proporción de su abundancia en el entorno ^{1,64,65}. Se pueden proponer como ejemplos concretos de AVL que representan competencia a *Vermamoeba vermiformis*, *Stenamoeba dejonckheerei* y *Acanthamoeba* spp., las cuales incluso han sido aisladas de aguas recreacionales geotermales ^{66,67}, demostrando su capacidad de permanecer y crecer a temperaturas elevadas. Además, la co-ocurrencia de *N. fowleri* con otros eucariotas como gusanos planos (*Stenostomum*) y rotíferos (*Monogononta*) ⁶⁸ ha sido demostrada; incluso con otras AVL que logran desplazar a *N. fowleri* en condiciones de laboratorio ⁶⁹.

De forma interesante, se ha reportado también la capacidad de ciertas bacterias que pueden habitar ambientes acuáticos, como *Pseudomonas* spp. y *Enrrobacter cloacae*, de producir compuestos nocivos para *N. fowleri*, como la piocianina de *P. aeruginosa*, que inhiben su multiplicación, comprometen su viabilidad e inducen cambios morfológicos bajo condiciones *in vitro* ⁷⁰; lo mismo se observó en *Bacillus licheniformis*, productora de amoebicinas ⁷¹.

La proporción de sitios positivos por *Naegleria* spp. fue de 29,2 % (7/24) [IC 95 %: 11,0-47,4], lo que se aproxima a resultados de encuestas de condiciones ambientales donde se ha trabajado con más de 100 cuerpos de agua, y se han encontrado prevalencias de 23,1 % de AVL, 34,6 % de *Naegleria* spp. y 0,9 % de *N. fowleri* ²⁴, o, en otro caso, con hallazgos de 23,1 % de *Naegleria* spp. y 1,9 % de *N. fowleri* ⁷². Específicamente, para *N. fowleri*, en la región de las Américas hay reportes de prevalencias desde el 2,0 % [IC 95 %: 0,2-7,0] (Brasil), 23,9 % [IC 95 %: 10,0 – 40,8] (México) y hasta 24,1 % [IC 95 %: 15,0-34,4] (EE. UU.) ⁷³. También hay datos globales de prevalencia en sitios similares a los incluidos

en este trabajo, como ríos con un 19,7 % [IC 95 %: 10,3 – 30,9 %] y lagos con un 33,0 % [IC 95 %: 12,6 – 56,7%] ⁷³.

En el análisis espacial de los sitios de muestreo, los resultados evidencian una predominancia de cobertura forestal en el área de influencia creada. La cercanía con asentamientos humanos y actividades agrícolas fue limitada, encontrándose solamente en tres lugares; sin embargo, se debe denotar que los sitios seleccionados son visitados para el turismo recreativo y muchos de estos cuerpos de agua se encuentran inmediatamente al lado o por debajo de la vía pública, lo que les hace fácilmente accesibles para la intromisión del ser humano en estos entornos. Aunque numerosos muestreos positivos de *N. fowleri* han resultado del estudio en lagos que reciben contaminación térmica ^{31,74}, se ha planteado también que los disturbios dados por actividades humanas en el entorno en el que habita la ameba pueden limitar su número ²⁶ o traducirse en estresores ambientales que aclaren la biota del entorno e influyan en la ocurrencia del patógeno ⁴¹.

Por otro lado, siendo que la presencia de *Naegleria* spp. termofilicas es susceptible a cambios climáticos, como lo sugiere la literatura ⁷⁵⁻⁷⁷, la ubicación de los sitios de muestreo por subregión climática permitió identificar patrones de lluvia y temperatura atmosférica para obtener datos relacionados al fenómeno. Con relación a los sitios catalogados como positivos por *Naegleria* spp. por métodos moleculares (PN2, RA3, RN1 y RN5), todos se tratan de áreas con temperaturas mínimas y máximas de 20-23 °C y 30-31 °C, respectivamente.

A pesar de que PN2 presenta un régimen de sequía, con menos de 100 días con lluvias al año y bosque tropical seco, la mayoría (RA3, RN1 y RN5) se caracteriza por presentar formación forestal de bosque tropical húmedo, con lluvias todo el año, sin periodo seco ⁴⁶. Las lluvias pueden favorecer la llegada de AVL como *Naegleria* spp. a los cuerpos de agua por medio de la escorrentía, pues su reservorio es el suelo ^{7,29}, aunque este

fenómeno es insuficiente para explicar en toda su amplitud los patrones de distribución de *N. fowleri*⁶⁷.

Con relación a la medición de parámetros fisicoquímicos, llama la atención aquellos parámetros tradicionalmente asociados con la presencia de *N. fowleri* como la temperatura, que osciló alrededor de los 25 °C, al tratarse en su mayoría de cuerpos naturales de agua no termal; solamente dos de los sitios visitados mostraron temperaturas superiores a los 30 °C. De acuerdo con la literatura, si bien las temperaturas superiores a los 30 °C coinciden con un mayor número de aislamientos de esta ameba, también se ha reportado que las formas quísticas pueden encontrarse en sedimentos del fondo de los cuerpos de agua a temperaturas tan bajas como 12 °C⁷⁸. En un trabajo realizado en el río Monjolinho, Brasil, se aislaron e identificaron amebas termotolerantes como *N. australiensis* y *N. philippinensis*, a partir de aguas con temperaturas entre 17,8 °C y 20,9 °C¹⁸; al igual que en México, donde se halló *N. fowleri* y *N. australiensis* en canales de riego a temperaturas de 17 °C⁷⁹. Es por esta razón que resulta importante monitorear aguas en un amplio rango de temperaturas y considerar el efecto de otras covariables que puedan incidir en la ocurrencia de la ameba³⁰. En coincidencia, en este caso los sitios positivos por *Naegleria* spp. presentaron temperaturas por debajo de los 28 °C.

Otro parámetro del agua particularmente estable fue el pH, con valores alrededor de 6,8, el cual se incluye dentro del rango de lo encontrado en hallazgos previos o trabajos *in vitro* con *N. fowleri*^{30,72,80,81}.

Sobre las mediciones en los sedimentos de los sitios de muestreo, los datos presentan alta variabilidad de acuerdo con las medidas de dispersión; principalmente en el caso de la conductividad eléctrica y las determinaciones de cationes, metales, limo y arcilla en el sedimento. Sin embargo, de acuerdo con la literatura consultada, es importante destacar que este se trata del primer intento de correlacionar parámetros del sedimento con

la presencia de *N. fowleri* en agua asociada con dicho sedimento, partiendo de la hipótesis de la permanencia de la ameba en estas matrices ricas en tapices bacterianos como las biopelículas, que constituyen una fuente de alimento ^{30,82}.

Se ha probado la importancia de metales como el hierro para *N. fowleri* ⁸³: parece favorecer la presencia de esta ameba, pues se ha encontrado en capas de lagos ricas en el metal, pero también su patogenicidad ⁸⁴. Además, Mach et al. ⁸⁵ demostraron que, en condiciones de baja disponibilidad de hierro, *N. gruberi*, una ameba no patógena cercana a *N. fowleri*, responde con mecanismos metabólicos de compensación. En este trabajo, las concentraciones de hierro biodisponible en los sedimentos fueron las más altas en comparación con las demás determinaciones en todos los sitios de muestreo, por lo que esta variable pudo no haber hecho diferencia en la distribución de *Naegleria* spp.

Siendo que existen otras especies del género *Naegleria* comparten características de supervivencia a altas temperaturas y/o patogenicidad, como *N. lovaniensis*, *N. australiensis* y *N. italica* ^{86,86} y, como una aproximación de la posibilidad de la presencia de *N. fowleri* en los cuerpos de agua estudiados, se realizaron análisis estadísticos inferenciales bivariados entre los múltiples datos ambientales recopilados (como variables independientes) y la positividad/negatividad molecular por *Naegleria* spp. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con las determinaciones de conductividad eléctrica y oxígeno disuelto en agua. Estos resultados describen una mayor concentración de oxígeno disuelto en los sitios positivos por *Naegleria* spp., lo que contrasta con alguna literatura que describe correlaciones negativas entre la abundancia de *N. fowleri* y el oxígeno disuelto, aunque debido a que este parámetro se ve afectado por la temperatura del agua, debe interpretarse con cautela ³⁰.

En condiciones similares a las aquí presentadas, con una mayoría de temperaturas entre los 20 °C y 30 °C, otros autores han obtenido correlaciones positivas con el oxígeno

disuelto en agua ⁸⁸, pero no así con la conductividad eléctrica. Los aumentos en la conductividad eléctrica se pueden asociar con la presencia de materia orgánica y actividades antropogénicas que elevan la concentración de compuestos como el K, Mg, Ca, carbonatos y sulfatos, por lo que se puede utilizar como indicador de contaminación (Baird C, Cann M. Environmental Chemistry 5ta Ed., 2012; como se citó en: Bellini et al., 2019).^{18,89} Sin embargo, los hallazgos de correlación con la presencia de *N. fowleri* han sido variables ³⁰. En este caso, el parámetro fue significativamente más bajo en sitios positivos por *Naegleria* spp., por lo que se puede plantear el favorecimiento ante una mejor calidad del agua.

También hubo significancia estadística en las comparaciones con la concentración de cobre y el porcentaje de arcilla en el sedimento (ambos parámetros más bajos en presencia de *Naegleria* sp). Aunque el cobre se reconoce como un elemento crucial para procesos biológicos en *Naegleria* spp., en altas cantidades tiene efectos tóxicos; además, ante la privación de cobre estas AVL realizan adaptaciones metabólicas ^{90,91}. Por otro lado, el 83,3 % de los sedimentos analizados correspondieron con textura arenosa, presentando cantidades muy bajas de limo y arcilla.

La positividad por *Naegleria* spp. solamente se detectó en lugares con sedimentos con este patrón de particulado arenoso. Según Rodríguez-Zaragoza (1994) ⁹², la textura controla la distribución de AVL pues estas, a su vez, inciden sobre las tasas de mineralización bacteriana y requieren de sustratos para adherirse y ejercer esta función. Hay coincidencia entre el resultado de menor porcentaje de arcilla en sedimentos con presencia de *Naegleria* spp. y resultados previos ⁴³ que señalan una mayor actividad microbiana (de bacterias y protistas) en sedimentos superficiales ricos en arena y bajos en arcilla. En un trabajo más reciente ⁹³, se observó mayor abundancia y diversidad bacteriana en suelos arcillosos irrigados con agua de planta de tratamiento. Sin embargo, de forma

interesante, en este mismo trabajo citado, la frecuencia de AVL como *Acanthamoeba* y *B. mandrillaris* fue muy superior en suelos con mayor proporción de arena y limo, que en los arcillosos.

A pesar de las asociaciones encontradas al comparar medidas de tendencia central entre grupos, las medidas de asociación epidemiológica mediante OR no resultaron significativas. Se debe considerar que, si bien la cantidad de variables es importante, el número de registros (n=24) limita la asociación y potencia estadística, pues al dividir los datos en las categorías de la variable dependiente, la frecuencia de variables independientes cualitativas puede ser muy baja, o bien, las variables cuantitativas se ven más influenciadas por la dispersión del conjunto de datos. Esto coincide con trabajos anteriores que no han demostrado el potencial predictor de diferentes compuestos o parámetros de calidad del agua sobre la permanencia de *N. fowleri* en entornos naturales ^{29,34,94}.

Los resultados de este trabajo enfrentan limitaciones de representatividad por el tamaño de la muestra y la selección no probabilística de las unidades muestrales; el marco muestral de este tipo de fuentes de agua superficial es complejo por la gran cantidad de cuerpos de agua existentes en el territorio nacional y sus características geográficas, de acceso y visitación. Por tanto, los hallazgos se plantean como desencadenantes de nuevas hipótesis que puedan confirmarse eventualmente por medio de estrategias de monitoreo ambiental diseñadas con el apoyo y el alcance de las autoridades sanitarias y ambientales. Adicionalmente, se recomienda que en estudios exploratorios posteriores se considere el aislamiento de AVL a partir de los sedimentos.

Finalmente, es posible sugerir, de manera general, que los cuerpos de agua incluidos en este trabajo poseen características ambientales (agua, sedimento, clima) adecuadas para la permanencia de *Naegleria* spp. y otras AVL en ellos, además de que *N.*

fowleri posiblemente enfrenta retos ecológicos por fenómenos de competencia. Sin embargo, dada la variabilidad de los parámetros medidos y el número limitado de sitios, no se obtuvo una relación clara con la presencia de *Naegleria* spp. Los hallazgos de esta propuesta de encuesta de vigilancia ambiental representan una mejora importante en el conocimiento sobre la presencia de *Naegleria* spp. en reservorios naturales de agua de Costa Rica y un punto de partida para sistematizar el monitoreo de AVL potencialmente patógenas en entornos de estrecho contacto con el ser humano.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Se obtuvo permiso de acceso a elementos de la biodiversidad de la Comisión Institucional de Biodiversidad (CBio) de la UCR, según establece la normativa nacional, mediante oficio CBio-15-2023.

El autor declara no tener conflictos de interés con relación al trabajo presentado.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se enmarca en un proyecto de investigación que fue seleccionado para recibir apoyo económico de la Beca para Investigación Científica Dra. Luz Claudio - Mount Sinai Scientific Scholarship “International Training in Environmental Health over the Lifespan” del programa de colaboración entre la UNA y la Icahn School of Medicine at Mount Sinai de Nueva York, razón por la cual se contó con los fondos de este galardón para la ejecución del proyecto.

El trabajo se desarrolló en el marco del proyecto C-3513, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la UCR y adscrito al CIET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Griffin JL. The Pathogenic Amoeboflagellate *Naegleria fowleri*? Environmental Isolations, Competitors, Ecologic Interactions, and the Flagellate-Empty Habitat Hypothesis. *J Protozool.* 1983;30(2):403-409. doi: 10.1111/j.1550-7408.1983.tb02939.x
2. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Vol. 7, *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd; 1997. p. 583–98. doi: 10.1111/j.1750-3639.1997.tb01076.x.
3. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50:1–26. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x.
4. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. Vol. 8, *Travel Med Infect Dis.* 2010. p. 201–6. doi:10.1016/j.tmaid.2010.06.001.
5. Gharpure R, Bliton J, Goodman A, Ali IKM, Yoder J, Cope JR. Epidemiology and Clinical Characteristics of Primary Amebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: A Global Review. Vol. 73, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2021:E19–27. doi.org/10.3201/eid2701.202119.
6. Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med.* 1966;1473–6. doi: 10.1056/NEJM196606302742605.
7. Moussa M, Tissot O, Guerlotté J, de Jonckheere JF, Talarmin A. Soil is the origin for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters. *Parasitol Res.* 2015;114(1):311–5. doi: 10.1007/s00436-014-4197-x.
8. Saberi R, Seifi Z, Dodangeh S, Najafi A, Abdollah Hosseini S, Anvari D, et al. A systematic literature review and meta-analysis on the global prevalence of *Naegleria*

- spp. in water sources. Vol. 67, Transboundary and Emerging Diseases. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 2389–402. doi: 10.1111/tbed.13635.
9. Méndez Paz F. The role of environmental epidemiology in its disciplinary development. 2011.
 10. Krishnamoorthi S, Sharma C, Mewara A, Khurana S. Environmental water surveillance for free-living amoeba in North India. *Indian J Med Microbiol.* 2022;40(3):389–93. doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.05.002.
 11. Malik MW, Awan UA, Ahmed H, Missaghi B, Afzal MS. Environmental surveillance of *Naegleria fowleri*: A way forward for control of primary amoebic meningoencephalitis cases in Pakistan. *Travel Medicine and Infectious Disease.* Elsevier Inc.; 2022; 45. doi: 10.1016/j.tmaid.2021.102235.
 12. Rivera F, Ramirez P, Vilaclara G, Robles E, Medinat F. A Survey of Pathogenic and Free-Living Amoebae Inhabiting Swimming Pool Water in Mexico City. *Environ Res.* 1983; 32:205–11. doi: 10.1016/0013-9351(83)90207-4.
 13. Baquero RA, Reyes-Batlle M, Nicola GG, Martín-Navarro CM, López-Arencia A, et al. Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathog Glob Health.* 2014;108(4):206–11. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000143.
 14. Lee DI, Park SH, Baek JH, Yoon JW, Jin SI, Han KE, et al. Identification of free-living amoebas in tap water of buildings with storage tanks in Korea. *Korean J Parasitol.* 2020;58(2):191–4. doi: 10.3347/kjp.2020.58.2.191.
 15. Reyes-Batlle M, Gabriel MF, Rodríguez-Expósito R, Felgueiras F, Sifaoui I, Mourão Z, et al. Evaluation of the occurrence of pathogenic free-living amoeba and bacteria in 20 public indoor swimming pool facilities. *Microbiol Open.* 2021;10(1). doi: 10.1002/mbo3.1159.

16. Potgieter N, van der Loo C, Barnard TG. Co-existence of free-living amoebae and potential human pathogenic bacteria isolated from rural household water storage containers. *Biology*. 2021;10(12). doi: 10.3390/biology10121228.
17. Ettinger MR, Webb SR, Harris SA, McIninch SP, Garman GC, Brown BL. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res*. 2002 Dec 1;89(1):6–15. doi: 10.1007/s00436-002-0707-3.
18. Bellini NK, da Fonseca ALM, Reyes-Batlle M, Lorenzo-Morales J, Rocha O, Thiemann OH. Isolation of *Naegleria* spp. from a brazilian water source. *Pathogens*. 2020;9(2). doi: 10.3390/pathogens9020090.
19. Lares-Jiménez LF, Lares-Villa F. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 2009;5(2):161–7. Disponible en: revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/167
20. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, Winiacka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of León, Nicaragua. *Rev Biol Trop*. 2008;56. Disponible en: scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442008000200003&lng=en&nrm=iso
21. Tanzifi A, Moghaddam Y, Dodangeh S, Daryani A, Sarvi S, Gholami S, et al. Detection and Molecular Characterization of Potentially Patho-genic Free-Living Amoebae from Recreational and Public Soils in Mazandaran, Northern Iran. *Iran J Parasitol*. 2021;16(2):295–304. doi: 10.18502/ijpa.v16i2.6316.
22. Al-Herrawy AZ, Gad MA. Isolation and molecular identification of *Naegleria fowleri* from Nile river, Egypt. *J Egyptian Public Health Assoc*. 2015;90(4):161–5. doi: 10.1097/01.EPX.0000475937.97216.03.
23. Kim MJ, Lee GC, Kim K, Lee H, Kim MY, Seo DK, et al. Surveillance of *Acanthamoeba* spp. and *Naegleria fowleri* in environmental water by using the

- duplex real-time PCR. Korean J Microbiol. 2018;54(2):98–104. doi: 10.7845/kjm.2018.8012.
24. Panda A, Khalil S, Mirdha BR, Singh Y, Kaushik S. Prevalence of *Naegleria fowleri* in environmental samples from northern part of India. PLoS One. 2015;10(10). doi: 10.1371/journal.pone.0137736.
25. Kyle DE, Noblet I. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. J Protozool. 1985;32(1):99–105. doi: 10.1111/j.1550-7408.1985.tb03022.x.
26. Jamerson M, Remmers K, Cabral G, Marciano-Cabral F. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* Amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. Parasitol Res. 2009;104(5):969–78. doi: 10.1007/s00436-008-1275-y.
27. Sifuentes LY, Choate BL, Gerba CP, Bright KR. The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 2014;49(11):1322–30. doi: 10.1080/10934529.2014.910342.
28. Lares-Villa F, Hernández-Peña C. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). Exp Parasitol. 2010;126(1):33–6. doi: 10.1016/j.exppara.2010.04.011
29. Moussa M, de Jonckheere JF, Guerlotté J, Richard V, Bastaraud A, Romana M, et al. Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies). PLoS One. 2013;8(1). doi.org/10.1371/journal.pone.0054414.
30. Stahl LM, Olson JB. Environmental abiotic and biotic factors affecting the distribution and abundance of *Naegleria fowleri*. FEMS Microbiol Ecol. 2021;97. doi: 10.1093/femsec/fiaa238.

31. Sykora, JL, Keleti G, Martinez, AAJ. Occurrence and Pathogenicity of *Naegleria fowleri* in Artificially Heated Waters. *Applied Environ Microbiol.* 1983;45. doi: 10.1128/aem.45.3.974-979.1983.
32. Xue J, Lamar FG, Zhang B, Lin S, Lamori JG, Sherchan SP. Quantitative assessment of *Naegleria fowleri* and fecal indicator bacteria in brackish water of Lake Pontchartrain, Louisiana. *Science Total Environ.* 2018;622–623:8–16. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.308.
33. Zbikowska E, Kletkiewicz H, Walczak M, Burkowska A. Coexistence of *Legionella pneumophila* bacteria and free-living amoebae in lakes serving as a cooling system of a power plant. *Water Air Soil Pollut.* 2014;225(8). doi: 10.1007/s11270-014-2066-y.
34. Laseke I, Korte J, Lamendella R, Kaneshiro ES, Marciano-Cabral F, Oerther DB. Identification of *Naegleria fowleri* in Warm Ground Water Aquifers. *J Environ Qual.* 2010;39(1):147–53. doi: 10.2134/jeq2009.0062.
35. Newsome AL, Wilhelm WE. Effect of exogenous iron on the viability of pathogenic *Naegleria fowleri* in serum. *Experientia.* 1981; 37:1160–2. doi: 10.1007/BF01989894.
36. Newsome AL, Wilhelm WE. Inhibition of *Naegleria fowleri* by Microbial Iron-Chelating Agents: Ecological Implications. *Applied Environ Microbiol.* 1983;45. doi: 10.1128/aem.45.2.665-668.1983.
37. Duma RJ. Study of pathogenic free-living amebas in freshwater in Virginia. *Environ Health Effects Res. Ser.* 1980.
38. Allan JD. Landscapes and riverscapes: The influence of land use on stream ecosystems. Vol. 35, *Annual Rev Ecol Evol System.* 2004:257–84. doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.120202.110122.

39. Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata ZI, Knowler DJ, Lévêque C, et al. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2006;81:163–82. doi: 10.1017/S1464793105006950.
40. Martinuzzi S, Januchowski-Hartley SR, Pracheil BM, McIntyre PB, Plantinga AJ, Lewis DJ, et al. Threats and opportunities for freshwater conservation under future land use change scenarios in the United States. *Glob Chang Biol*. 2014;20(1):113–24. doi: 10.1111/gcb.12383.
41. Detterline JL, Wilhelm WE. Survey of Pathogenic *Naegleria fowleri* and Thermotolerant Amebas in Federal Waters. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1991;110. doi.org: 10.2307/3226659.
42. Last WM. Textural analysis of lake sediments. En: Last WM, Smol JP, editors. *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*. 2001. ISBN: 978-1-4020-0681-4.
43. Beloin RM, Sinclair JL, Ghiorse WC. Distribution and Activity of Microorganisms in Subsurface Sediments of a Pristine Study Site in Oklahoma. 1988;16. doi: 10.1007/BF02097407.
44. Abrahams-Sandí E, Retana-Moreira L, Castro-Castillo A, Reyes-Batlle M, Lorenzo-Morales J. Fatal Meningoencephalitis in Child and Isolation of *Naegleria fowleri* from Hot Springs in Costa Rica. *Emerging Infect Dis*. 2015;21(2):382–4. doi: 10.3201/eid2102.141576.
45. Retana Moreira L, Zamora Rojas L, Grijalba Murillo, Molina Castro SE, Abrahams Sandí E. Primary amebic meningoencephalitis related to groundwater in Costa Rica: Diagnostic confirmation of three cases and environmental investigation. *Pathogens*. 2020;9(8):1–9. doi: 10.3390/pathogens9080629.

46. Solano Quintero J, Villalobos Flores R. Aspectos Fisiográficos aplicados a un Bosquejo de Regionalización Geográfico Climático de Costa Rica. *Top Meteor Oceanog.* 2001;8(1):26–39.
47. Dirección de Cambio Climático (MINAE), MIDEPLAN, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Centro Científico Tropical. Plan de acción regional para la adaptación al cambio climático. 2022-2026 Chorotega. 2022. Disponible en: cambioclimatico.go.cr/
48. Dirección de Cambio Climático (MINAE), MIDEPLAN, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Centro Científico Tropical. Plan de acción regional para la adaptación al cambio climático. 2022-2026 Huetar Caribe. San José; 2022. Disponible en: cambioclimatico.go.cr/
49. Dirección de Cambio Climático (MINAE), MIDEPLAN, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Centro Científico Tropical. Plan de acción regional para la adaptación al cambio climático. Huetar Norte. San José; 2022. Disponible en: cambioclimatico.go.cr/
50. Stratton SJ. Population Sampling: Probability and Non-Probability Techniques. *Prehosp Disaster Med.* 2023 Apr 1;38(2):147–8. doi: 10.1017/S1049023X23000304.
51. Aplitop - Land Surveying & Civil Engineering Solutions. Software topográfico para GPS TcpGPS 2.5. 2023. <https://www.aplitop.com/software/tcp-gps>
52. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Baird RB, Eaton AD, Rice EW (Eds.). 2017. 1–1546 p.
53. Taft RA, Jones C. Sediment Sampling Guide and Methodologies. Ohio EPA Columbus; 2001. 36 p.
54. De Jonckheere JF, Brown S. The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist.* 2005;156(1):89–96. doi:10.1016/j.protis.2004.11.001.

55. QGIS.org. QGIS 3.30.3 Geographic Information System. QGIS Association. Open Source Geospatial Foundation Project. 2023. <http://qgis.org>
56. Decreto N° 25271 Reglamento a la Ley Forestal N° 7575. Diario Oficial La Gaceta. 1996 Abr 16. Disponible en: imprentanacional.go.cr/gaceta/?date=11/01/2022
57. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. Second Edition. New York: John Wiley & Sons; 2000.
58. Akaike, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. En: B. N. Petrov & F. Csáki (Eds.), 2nd international symposium on information theory. 1973, pp. 267–281). Budapest, Hungary: Akadémia Kiadó.
59. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 14. 2015. College Station, TX: StataCorp LLC.
60. Aykur M, Dagci H. Molecular identification of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* in soil samples using quantitative real-time PCR assay in Turkey; Hidden danger in the soil! Acta Trop. 2023;244. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106956
61. Fan S, Shen Y, Qian L. Social life of free-living amoebae in aquatic environment-comprehensive insights into interactions of free-living amoebae with neighboring microorganisms. Frontiers in Microbiology. 2024;15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1382075
62. Tapia JL, Torres BN, Visvesvara GS. Balamuthia mandrillaris: *In vitro* interactions with selected protozoa and algae. Journal of Eukaryotic Microbiology. 2013;60(5):448–54. doi: 10.1111/jeu.12052
63. Plasson F, Mameri MO. Method for biologically combating *Naegleria fowleri*, and disinfecting agent containing protozoa of the species *Willaertia magna*. 2018.
64. Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? Trends Parasitol. 2020;36:19–28. doi: 10.1016/j.pt.2019.10.008.

65. Stevens A, De Jonckheere J, Willaert E. *Naegleria lovaniensis* new species : isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. Int J Parasitol. 1980;10:51–64. doi: 10.1016/0020-7519(80)90064-8
66. Solgi R, Niyayati M, Haghghi A, Nazemalhosseini Mojarad E. Occurrence of Thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* Spp. in Hot Springs of Ardebil Province, Northwest Iran. Iranian J Parasitol. 2012;7(2):47–52.
67. Vingataramin Y, Quétel I, Pons MA, Talarmin A, Marcelino I. Spatiotemporal distribution of thermophilic free-living amoebae in recreational waters: A 5-year survey in Guadeloupe (French West Indies). Science of the Total Environment. 2024;941. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173318
68. Morgan MJ, Halstrom S, Wylie JT, Walsh T, Kaksonen AH, Sutton D, et al. Characterization of a Drinking Water Distribution Pipeline Terminally Colonized by *Naegleria fowleri*. Environ Sci Technol. 2016;50(6):2890–8. doi: 10.1021/acs.est.5b05657.
69. Miller HC, Morgan MJ, Walsh T, Wylie JT, Kaksonen AH, Puzon GJ. Preferential feeding in *Naegleria fowleri*; intracellular bacteria isolated from amoebae in operational drinking water distribution systems. Water Res. 2018;141:126–34. doi: 10.1016/j.watres.2018.05.004
70. Ruenchit P, Whangviboonkij N, Sawasdipokin H, Phumisantiphong U, Chaicumpa W. A search for anti-*Naegleria fowleri* agents based on competitive exclusion behavior of microorganisms in natural aquatic environments. Pathogens. 2021;10(2):1–13. doi: 10.3390/pathogens10020142
71. Lebbadi M, Valdivia E, Gálvez A, Gálvez G, Martínez M, Martínez-Bueno M, et al. Cocultivation of the Amoeba *Naegleria fowleri* and the Amoebicin-Producing Strain

Bacillus licheniformis M-4. Applied and Environmental Microbiology;61. 1995.

Disponible en: <https://journals.asm.org/journal/aem>

72. Gunarathna N, Amarasinghe A, Wijesundara S, Iddawela D, Wickramasinghe S. Isolation, molecular characterization and phylogeny of *Naegleria* species in water bodies of North-Western Province, Sri Lanka. PLoS One. 2021;16. doi: 10.1371/journal.pone.0248510
73. Leal dos Santos D, Chaúque BJM, Virginio VG, Cossa VC, Pettan-Brewer C, Schrekker HS, et al. Occurrence of *Naegleria fowleri* and their implication for health - a look under the One Health approaches. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2022;246. doi: 10.1016/j.ijheh.2022.114053
74. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F. Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. Parasitol Res. 2007;100(6):1249–56. doi: 10.1007/s00436-006-0399-1.
75. Gharpure R, Gleason M, Salah Z, Blackstock AJ, Hess-Homeier D, Yoder JS, et al. Geographic range of recreational water-associated primary amebic meningoencephalitis, United States, 1978-2018. Emerg Infect Dis. 2021;27(1):271–4. doi: 10.3201/eid2701.202119.
76. Cooper AM, Aouthmany S, Shah K, Rega PP. Killer amoebas: Primary amoebic meningoencephalitis in a changing climate. J Am Acad Physician Assist. 2019;32(6):30–5. doi: 10.1097/01.JAA.0000558238.99250.4a.
77. Dey R, Dlusskaya E, Oloroso M, Ashbolt NJ. First evidence of free-living *Naegleria* species in recreational lakes of Alberta, Canada. J Water Health. 2023;21(3):439–42. doi: 10.2166/wh.2023.325
78. Wellings,FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and Identification of Pathogenic *Naegleria* from Florida Lakes. Applied Environ Microbiol. 1977. doi: 10.1128/aem.34.6.661-667.1977. doi: 10.1128/aem.34.6.661-667.1977

79. Bonilla-Lemus P, Rojas-Hernández S, Ramírez-Flores E, Castillo-Ramírez DA, Monsalvo-Reyes AC, Ramírez-Flores MA, et al. Isolation and identification of *Naegleria* species in irrigation channels for recreational use in Mexicali valley, Mexico. *Pathogens*. 2020;9(10):1–14. doi: 10.3390/pathogens9100820
80. John-Marsha DT, Howard J. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res*. 1995;81. doi: 10.1007/BF00937109.
81. Lam C, He L, Marciano-Cabral F. The Effect of Different Environmental Conditions on the Viability of *Naegleria fowleri* Amoebae. *J Eukaryotic Microbiol*. 2019;66(5):752–6. doi: 10.1111/jeu.12719.
82. Goudot S, Mathieu L, Herbelin P, Soreau S, Jorand FPA. Growth dynamic of biofilm-associated *Naegleria fowleri* in freshwater on various materials. *Front Microbiol*. 2024;15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1369665
83. Arbon D, Ženíšková K, Mach J, Grechnikova M, Malych R, Talacko P, et al. Adaptive iron utilization compensates for the lack of an inducible uptake system in *Naegleria fowleri* and represents a potential target for therapeutic intervention. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(6). doi: 10.1371/journal.pntd.0007759
84. Maciver SK, McLaughlin PJ, Apps DK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Opinion: Iron, Climate Change and the 'Brain Eating Amoeba' *Naegleria fowleri*. *Protist*. 2021;172(1):125791. doi: 10.1016/j.protis.2020.125791
85. Mach J, Bíla J, Ženíšková K, Arbon D, Malych R, Glavanakovová M, et al. Iron economy in *Naegleria gruberi* reflects its metabolic flexibility. *Int J Parasitol*. 2018;48(9–10):719–27. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.03.005
86. Shahin SA, Alarcon JH, Brosky HN, Lamori JG, Dada AC, Xue J, et al. Occurrence of *Naegleria fowleri* and faecal indicators in sediments from Lake Pontchartrain, Louisiana. *J Water Health*. 2022;20(4):657–69. doi: 10.2166/wh.2022.285

87. De Jockheere. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol.* 2014;145:S2-S9. doi:10.1016/j.exp.para.2014.07.011
88. Guzmán-Fierros E, De Jonckheere J, Lares-Villa F. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 2008;79:1-6.
89. Baird C.; Cann, M. *Environmental Chemistry*, 5th ed.; W. H. Freeman, Macmillan: New York, NY, USA, 2012.
90. Grechnikova M, Ženíšková K, Malych R, Mach J, Sutak R. Copper detoxification machinery of the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri* involves copper-translocating ATPase and the antioxidant system. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2020;14:126–35. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.10.001
91. Ženíšková K, Grechnikova M, Sutak R. Copper Metabolism in *Naegleria gruberi* and Its Deadly Relative *Naegleria fowleri*. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. doi: 10.3389/fcell.2022.853463
92. Rodriguez-Zaragoza S. Ecology of Free-Living Amoebae. Vol. 20, *Critical Rev Microbiol.* 1994. doi: 10.3109/10408419409114556.
93. Obayomi O, Bernstein N, Edelstein M, Vonshak A, Ghazayarn L, Ben-Hur M, et al. Importance of soil texture to the fate of pathogens introduced by irrigation with treated wastewater. *Science of the Total Environment.* 2019;653:886–96. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.378
94. Najafpoor AA, Zarrinfar H, Ghaderifar S, Alidadi H, Esmaily H, Hajjalilo E, et al. *Naegleria* species population found in pond water of parks in Mashhad City. Can the physicochemical factors affect it? *MethodsX.* 2018;5:1427–30. doi: 10.1016/j.mex.2018.10.014.

ARTÍCULO II

CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y PRÁCTICAS SOBRE LA INFECCIÓN POR *Naegleria fowleri* EN VISITANTES DE CUERPOS DE AGUA DULCE CON ALTA PREVALENCIA DE VAHLKÁMPFIDOS

CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS SOBRE A INFEÇÃO POR *Naegleria fowleri* EM VISITANTES DE CORPOS DE ÁGUA DOCE COM ALTA PREVALÊNCIA DE VAHLKAMPFÍDEOS

KNOWLEDGE, ATTITUDES, AND PRACTICES REGARDING *Naegleria fowleri* INFECTION AMONG VISITORS TO FRESHWATER BODIES WITH HIGH PREVALENCE OF VAHLKAMPFIIDS

Este artículo se someterá a la Revista de Salud Ambiental, órgano de la Sociedad Española de Salud Ambiental, Sociedade Portuguesa de Saúde Ambiental y de la Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental (<https://salud-ambiental.com/revista/>). Ver Anexo 1.

RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) de la familia Vahlkampfiidae (VAHL) son de amplia distribución en la naturaleza, ocupando hábitats acuáticos y terrestres. El grupo incluye organismos anfizoicos como *Naegleria fowleri*, agente causal de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). Este estudio pretendió determinar la presencia de AVL de esta familia capaces de crecer a temperaturas elevadas y del género *Naegleria* en diferentes

fuentes de agua recreacionales de Costa Rica durante 2023, así como el perfil de conocimientos, actitudes y práctica (CAP) de las personas en relación con la infección por *N. fowleri*. Se muestreó agua de 24 sitios y se hizo cultivo a 42 °C, aislamiento y pruebas moleculares, resultando 20 sitios VAHL positivos y siete positivos por *Naegleria* spp., pero la identificación por secuenciación solo detectó *Tetramitus* spp. predominantemente, seguida de *Vahlkampfia* sp. y *Neovahlkampfia* sp. Se aplicó una encuesta CAP a 72 personas entre 18 y 66 años, de las cuales un 37,5 % no había escuchado sobre *N. fowleri*, y se obtuvo puntajes generales de 35,8 % de conocimiento, y 3,01 y 2,16 para actitudes y prácticas, siendo cinco el valor más favorable o de menor riesgo. Las pruebas estadísticas arrojaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el nivel de conocimiento según el género y la procedencia de la persona. Los resultados apuntan a una alta frecuencia de AVL termotolerantes en aguas superficiales no termales en Costa Rica con capacidad de proliferar a altas temperaturas; mientras la encuesta CAP, evidencia bajo nivel de conocimiento y deficiencias en el manejo y prevención del riesgo de MAP en la población expuesta a reservorios naturales de agua dulce.

RESUMO

As amebas de vida livre (AVL) Vahlkampfiid estão amplamente distribuídas na natureza, ocupando habitats aquáticos e terrestres. O grupo inclui parasitas anfitriões como *Naegleria fowleri*, o agente causador da meningoencefalite amebiana primária (MAP). Este estudo teve como objetivo determinar a presença de AVL da família Vahlkampfiidae (VAHL) capaz de crescer em temperaturas elevadas e do gênero *Naegleria* em diferentes fontes de água recreativa na Costa Rica durante 2023, bem como o perfil do conhecimentos, atitudes e práticas (CAP) das pessoas em relação à infecção por *N. fowleri*. A água foi amostrada em 24 locais e cultura a 42 °C, isolamento e testes moleculares foram realizados, resultando em 20 locais positivos para VAHL, sete positivos para *Naegleria* spp., mas a identificação

por sequenciamento detectou apenas *Tetramitus* spp. predominantemente, seguido por *Vahlkampfia* sp. e *Neovahlkampfia* sp. Uma pesquisa CAP foi aplicada a 72 pessoas entre 18 e 66 anos, das quais 37,5 % não tinham ouvido falar sobre *N. fowleri*, e foram obtidas pontuações gerais de 35,8 % para conhecimento, e 3,01 e 2,16 para atitudes e práticas, sendo cinco o valor mais favorável ou de menor risco. Os testes estatísticos mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) no nível de conhecimento segundo o sexo e a origem da pessoa. Os resultados indicam alta frequência de AVL termotolerante em águas superficiais não térmicas na Costa Rica com capacidade de proliferar em altas temperaturas; enquanto o inquérito CAP evidencia um baixo nível de conhecimento e deficiências na gestão e prevenção do risco de MAP na população exposta a reservatórios naturais de água doce.

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) of the Vahlkampfiidae family (VAHL) are widely distributed in nature, occupying aquatic and terrestrial habitats. The group included amphizoic organisms such as *Naegleria fowleri*, the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis. This study aims to determine the presence of FLA of this family capable of growing at elevated temperatures and the genus *Naegleria* in different recreational water sources in Costa Rica during 2023, as well as people knowledge-attitude-practices (KAP) profile in relation to infection by *N. fowleri*. Water samples were taken in 24 locations and culture at 42 °C, isolation and molecular tests were performed, resulting in 20 locations positive for VAHL and seven positives for *Naegleria* spp., but sequencing identification detected only *Tetramitus* spp. predominantly, followed by *Vahlkampfia* sp. and *Neovahlkampfia* sp. A KAP survey was applied to 72 people between 18 and 66 years old, of which 37,5 % had never heard about *N. fowleri*, and average scores of 35,8% for knowledge, and 3,01 and 2,16 for attitudes and practices were obtained, being five the favorable or lower risk value. The statistical tests showed significant differences ($p < 0,05$) between the level of knowledge

and gender/residence origin of the person. These results indicate a high frequency of thermotolerant FLA in non-thermal surface waters in Costa Rica with the ability to proliferate at high temperatures. Whilst KAP survey showed a low level of knowledge and deficiencies in the management and prevention of PAM risk in the population exposed to natural freshwater reservoirs.

PALABRAS CLAVE / PALAVRAS-CHAVE / KEYWORDS

Vahlkampfiidae; *Naegleria fowleri*; recreación; riesgo; conocimientos; actitudes; prácticas

Vahlkampfiidae; *Naegleria fowleri*; recreação; risco; conhecimentos; atitudes; práticas

Vahlkampfiidae; *Naegleria fowleri*; recreation; risk; knowledge; attitudes; practices

INTRODUCCIÓN

Naegleria fowleri es una ameba de vida libre (AVL) termofílica, perteneciente a la familia Vahlkampfiidae (VAHL) de la clase Heterolobosea, capaz de producir un cuadro muy letal en seres humanos: la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) ¹. Esta infección es de abordaje complicado pues su curso es muy agudo, siendo fatal en la mayoría de los casos; además, su diagnóstico no está estandarizado y no existe un esquema de tratamiento definido. En general, es una enfermedad poco conocida de la que se sospecha rara vez ²⁻⁵.

Tras los primeros reportes de MAP durante la década de los 60s en Australia y los Estados Unidos de América (EE. UU.) ⁶⁻⁸, un estudio bibliométrico señala que, de 1970 a 2021, el número de artículos publicados y citas sobre *N. fowleri* ha venido en aumento sostenido, siendo más notorio después del 2000, sobre todo en EE. UU., México y Australia como principales países de origen ⁹. Mucha de esta literatura se trata de reportes de caso, por lo que se trata de una aproximación al comportamiento de estos casos. Se ha señalado,

además, que de 1965 a 2016 los casos reportados aumentaron un 1,6 % por año (IC 95 %: 0,6 – 2,6) ².

A pesar de las dificultades intrínsecas para establecer indicadores epidemiológicos alrededor de este evento, la ocurrencia global se ha tratado de dilucidar en los últimos años, contabilizándose un total de 381 casos, 32 sobrevivientes y una letalidad del 92 % de 1962 a 2018, según el sistema de vigilancia de AVL de los “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) y la consulta en fuentes bibliográficas ². Con la misma intención, en 2020, Maciver et al. ¹⁰ reportaron 431 casos en la literatura, muchos de ellos presentándose como parte de brotes, con un 95 % de letalidad y solo 21 casos exitosamente tratados. Esta diferencia también expone la problemática de registro no sistemático que lleva a conteos erróneos y subestimaciones. Con base en factores de riesgo conocidos para la MAP y muertes por infecciones neurológicas no especificadas, se hizo una estimación de posibles casos subdiagnosticados de MAP en EE. UU., con 16 muertes anuales de 1999 a 2010 que calzaron con el patrón típico del cuadro clínico ¹¹.

La MAP se ha reportado en cerca de 33 países distintos, siendo su hallazgo de forma más frecuente en personas jóvenes (edad media de 14 años, con un rango de un mes hasta 85 años) del sexo masculino ². Dentro de los principales determinantes asociados a los casos descritos se encuentran las actividades acuáticas (nado y zambullidos principalmente, baño recreativo, deportes, irrigación nasal, salpicaduras, festivales), así como la exposición a fuentes de agua como lagos, pozas, piscinas y, en menor medida, agua de grifo, canales, zanjas, charcos, ríos, aguas termales y reservorios artificiales de agua.

En un trabajo publicado en 2021, Gharpure *et al.* ¹² mencionan una exposición de 85 pacientes a aguas recreacionales de los 120 casos reportados en la base de datos de los CDC de EE. UU. entre 1978 y 2018: 69 a lagos o pozas, 14 a ríos y dos a eventos

acuáticos. A nivel global, un metaanálisis de 575 publicaciones (de 35 países diferentes) arrojó una prevalencia agrupada de *N. fowleri* en fuentes de agua de 23,3 % ¹³. En Costa Rica se han suscitado cuatro casos confirmados por laboratorio y asociados a las zonas de San Carlos, Guanacaste y Limón ^{14,15}.

Siendo que la principal fuente infección son cuerpos de agua naturales, las condiciones climatológicas pueden incidir en la ocurrencia del fenómeno. Gharpure et al. ² señalan que, de 315 casos reportados, un 85 % se describieron asociados a estación seca o verano. Asimismo, en el caso de EE. UU., la mayoría se han ubicado en estados del sur y el oeste, como Florida y Texas, pero se calcula una variación de 13,3 km hacia el norte del país cada año ¹², lo cual puede evidenciar los efectos del cambio climático y de la potencial redistribución del evento hacia zonas templadas.

Las actividades recreativas en aguas naturales o artificiales son entonces un factor de riesgo a considerar cuando se estudia el fenómeno de la MAP. Sin embargo, se debe integrar esta noción con la idea de que la distribución geográfica de los casos también apunta a un riesgo en sitios con temperaturas más elevadas. Por ejemplo, hay reportes de exposiciones a piscinas privadas ubicadas en lugares cálidos como California (EE. UU.) e India, que dieron lugar a la infección ^{16,17}. Otros casos asociados a aguas recreacionales en parques acuáticos evidencian el peligro dado por inmersiones agresivas ^{18,19}.

Los cuerpos de agua dulce también son sitios con potencial para adquirir la infección, principalmente aquellos en los que puede haber elevación de temperatura del agua, ya sea por efectos naturales como las condiciones atmosféricas del lugar o la contaminación térmica proveniente de plantas eléctricas ²⁰⁻²³. Esto señala que el monitoreo de las fuentes de agua con las que el ser humano puede tener contacto es indispensable ante el riesgo que suponen las características de la ameba y la evidencia epidemiológica sobre la ocurrencia del cuadro.

Los modelos de encuestas de conocimientos, actitudes y práctica (CAP) se han utilizado vastamente en problemas de salud pública porque permiten establecer una línea de partida para diseñar políticas de promoción de la salud, programas de prevención y educativos, así como medir efectividad de intervenciones, con base en los hallazgos de la conducta, barreras y la respuesta social ante determinados fenómenos ²⁴. Ante eventos emergentes como el caso de las enfermedades causadas por AVL, trazar una base de la comprensión social permite obtener información valiosa para el proceder preventivo ²⁵.

Dado el componente ecológico y conductual de la enfermedad, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de AVL de la familia Vahlkampfiidae capaces de crecer a temperaturas elevadas en diferentes fuentes de agua dulce naturales recreacionales de Costa Rica durante 2023, así como el perfil de las personas visitantes sobre conocimientos, actitudes y prácticas en relación con la infección por *N. fowleri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo de agua

Se planteó un estudio de tipo transversal descriptivo y analítico para estudiar cuerpos naturales de agua dulce ubicados en las regiones Chorotega, Huetar Norte y Huetar Caribe, lugares donde se encuentran las fuentes de agua con las que se estableció el nexo epidemiológico en los casos de MAP en Costa Rica ^{14,15}. Se definió un marco muestral mínimo de veinte sitios para realizar un muestreo por conveniencia (no probabilístico), identificando los cuerpos de agua a partir de la consulta a las Cámaras de Turismo de las regiones de interés, y que fueran reconocidos como destinos turísticos de acceso público, gratuito o administrado por una Asociación de Desarrollo Comunal, cuya topografía permitiera el fácil ingreso. Todos los sitios de muestreo se georreferenciaron por

medio de la aplicación móvil con sistema de posicionamiento global TcpGPS (Aplitop - Surveying & Civil Engineering Solutions, España) ²⁶.

En cada cuerpo de agua se tomaron cuatro submuestras de agua que posteriormente conformaron una única muestra compuesta representativa del lugar. Las muestras de agua se recolectaron según los procedimientos de “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2017” ²⁷ con algunas adaptaciones de la metodología de Lares Villa et al. ²⁸: a una profundidad de 30 cm, se removió el sedimento y se dejó asentar, para luego tomar la muestra utilizando bolsas estériles de 450 mL (LABPLAS Inc., Canada). El transporte y almacenamiento de las muestras se realizó a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio.

Aislamiento e identificación de AVL

Se siguió la metodología descrita por Alvarado-Ocampo et al. ²⁹. Brevemente:

Cultivo de muestras: el volumen final total de cada muestra de agua compuesta (1.8 L) se filtró a través de membranas de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm (Merck-KGaA, Darmstadt, Germany) y el filtro se colocó en placas de agar no nutritivo 1,5 % suplementado con *Escherichia coli*. Las placas se incubaron a 42 °C por al menos siete días y las amebas que crecieron fueron subcultivadas transfiriendo una pequeña cantidad del cultivo a un nuevo medio de cultivo para seleccionirlas y propagarlas. Las placas con crecimiento se lavaron con 1,0 mL de PBS estéril frío, se transfirió el material lavado a tubos Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se descartó y el sedimento se utilizó para las pruebas moleculares.

Extracción de ADN: a partir del sedimento resultante del paso anterior se siguieron las instrucciones del fabricante del kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Los

productos se cuantificaron mediante el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y se almacenaron a - 20 °C.

Amplificación por PCR y secuenciación: se amplificó la región ITS completa (ITS1, ITS2 y 5.8S) según De Jonckheere & Brown ³⁰, para lo cual se utilizaron los primers específicos para Vahlkampfiidae, familia taxonómica de *N. fowleri* (Vahl-F: 5'-GTCTTCGTAGGTGAACCTGC-3', Vahl-R: 5'-CCGCTTACTGATATGCTTAA-3') y para el género *Naegleria* (ITSFW: 5'-AACCTGCGTAGGGATCATTT-3' y ITSRV 5'-TTTCCTCCCCTTATTAATAT-3'). Se siguió el protocolo de PCR y electroforesis descrito por Retana Moreira et al. ¹⁵. Se utilizaron controles negativos (agua destilada) y positivos (ADN de la cepa de *N. fowleri* Lee ATCC 30808). Los productos de PCR para Vahlkampfiidae se purificaron y secuenciaron con lectura pareada por electroforesis capilar a través de un servicio comercial (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Encuesta exploratoria CAP sobre la infección por *N. fowleri* y su riesgo

Al momento de la visita a los distintos sitios de muestreo, se seleccionaron turistas mayores de edad (con 18 años cumplidos o más), con el fin de administrar un cuestionario. Previo a su aplicación, se brindó información sobre el estudio para procurar y asegurar un consentimiento de participación.

Instrumento: se utilizó un cuestionario estructurado, con preguntas cerradas y precodificadas, mediante el cual se recabó información para construir el perfil demográfico, así como de CAP de las personas visitantes de los cuerpos de agua muestreados, con relación al cuadro clínico de MAP, así como el riesgo y las medidas para prevenir la infección por *N. fowleri*. El trabajo de Shakeel et al. ³¹ es cercano al objeto de estudio de este trabajo y permitió construir la base de esta herramienta; sin embargo, en otras temáticas vinculadas con enfermedades transmisibles existen también referencias de

encuestas validadas ³² que aportan en ámbitos como el aquí planteado. El instrumento fue revisado por un experto en sociología para evaluar y corregir el tipo y calidad de las preguntas, así como la claridad de los conceptos.

Escalas de medición: el conocimiento sobre la ameba, la MAP y las formas de prevenir la infección se evaluaron por medio del número de respuestas correctas sobre el tema ³³. El comportamiento en términos de actitudes y prácticas frente a la infección y los riesgos para adquirirla en sitios recreativos se midió a través de un Escalamiento de Likert, donde se plantearon una serie de afirmaciones y posibles respuestas: “totalmente de acuerdo/siempre”, “de acuerdo/la mayoría de las veces sí”, “ni de acuerdo ni en desacuerdo/algunas veces sí, algunas veces no”, “en desacuerdo/la mayoría de las veces no”, y “totalmente en desacuerdo/nunca”, que se puntuaron del cinco al uno, respectivamente ³⁴. Se calificó el comportamiento de riesgo dividiendo la puntuación total entre el número de afirmaciones ³⁵.

Análisis: se utilizó estadística descriptiva para resumir, organizar y presentar la información sociodemográfica y de CAP derivada de la encuesta a turistas por medio de frecuencias y porcentajes con sus respectivos IC 95 %: procedencia, género (femenino, FEM; masculino, MAS), edad, grupo de edad (variable recategorizada en dos grupos a partir del dato numérico de edad), número de respuesta correctas con relación al conocimiento y puntajes de actitudes y prácticas derivadas de la escala Likert. Se crearon dos grupos de edad (18-39 años y \geq 40 años), con base en la clasificación dada por Martín Ruiz ³⁶, en la que separa a los adultos jóvenes (20-39) de los adultos medios (40-49) y adultos maduros (desde los 50). También se generaron las categorías de procedencia según condición de extranjero no residente declarada durante la encuesta y de acuerdo con la Actualización del Plan Regional de la Gran Área Metropolitana (GAM) 2013-2030 (N° 38334-PLAN-

MINAE-MIVAH-MOPT-S-MAG) ³⁷ para clasificar a las personas residentes como procedentes de la GAM o no.

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los conjuntos de las variables cuantitativas (edad, puntajes de conocimiento, actitudes y prácticas), para luego utilizar estadísticos no paramétricos que buscaran probar la asociación entre las variables CAP (Rho de Spearman, $\alpha = 0,05$) y con otras variables categóricas como la procedencia, el grupo de edad, el género, la condición de local (Suma de rangos de Wilcoxon, $\alpha = 0,05$) y la procedencia (Kruskall Wallis, $\alpha = 0,05$).

Para el atributo de conocimientos se compararon las frecuencias de acierto con las categorías de las variables: procedencia, género y grupo de edad (Chi cuadrado de Pearson, $\alpha = 0,05$). Todos los análisis descritos se ejecutaron en el paquete estadístico STATA® v. 14 (Stata Corp LLC, TX, USA) ³⁸.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de AVL

Se muestrearon 24 cuerpos de agua, en el periodo comprendido entre julio y noviembre de 2023. Se recolectaron 96 submuestras de agua, de las cuales 56 (provenientes de 22 de los sitios de muestreo) presentaron aislamiento positivo a 42 °C. Se seleccionaron y subcultivaron los diferentes morfotipos de cada sitio para ser identificados por métodos moleculares. La PCR para familia Vahlkampfiidae resultó positiva en los aislamientos de 20 sitios de muestreo (Cuadro 1, Figura 1).

El análisis de las secuencias permitió identificar aislamientos de nueve de los cuerpos de agua, mientras que, para los restantes 11 lugares, la identificación por secuenciación fue indeterminada. Ninguna de las identificaciones coincidió con *Naegleria*. Sin embargo, la PCR a nivel de género *Naegleria* detectó 11 muestras positivas,

provenientes de siete sitios de muestreo (cinco de la Región Huetar Norte, uno de la Región Chorotega y uno de la Región Huetar Caribe).

Cuadro 1. Detección por PCR de AVL de la familia Vahlkampfiidae (VAHL) y el género *Naegleria* en aislamientos realizados a partir de cuerpos de agua dulce visitados para la recreación, por región geográfico-administrativa.

Sitio de muestreo	Codificación	Porcentaje de submuestras con aislamiento a 42 °C	PCR-VAHL	PCR- <i>Naegleria</i>
Región Chorotega				
Río Blanco, Curubandé	CHO1	50	POS	NEG
Llanos de Cortés	CHO2	50	POS	NEG
Poza La Escondida	CHO3	50	POS	POS
Región Huetar Caribe				
Río Blanco, Guápiles	HCA1	0	NA	NA
La Cueva del Murciélago	HCA2	25	POS	POS
El Coco	HCA3	100	POS	NEG
Río Parismina	HCA4	100	NEG	NEG
Poza de Calle Vieja	HCA5	100	POS	NEG
Región Huetar Norte				
El Castillo	HNO1	50	POS	POS
Río Agua Caliente	HNO2	0	NA	NA
El Choyín	HNO3	75	POS	NEG
El Salto de Río Fortuna	HNO4	100	POS	NEG
Poza La Pechuga	HNO5	100	POS	NEG
El Tururún	HNO6	50	NEG	NEG
La Palmera	HNO7	100	POS	NEG
Cárcel La Marina	HNO8	75	POS	NEG
El Tucano	HNO9	75	POS	NEG
Catarata Calle Damas	HNO10	25	POS	NEG
Vado Río Tres Amigos	HNO11	75	POS	POS
Laguna Itzayana	HNO12	25	POS	NEG
Laguna Río Cuarto	HNO13	50	POS	NEG
Poza Las Vegas	HNO14	50	POS	POS
Poza de Los Novios	HNO15	25	POS	POS
Río Mamonal	HNO16	50	POS	POS

Frecuencia relativa (n=24)	91,7	83,3	29,2
POS: positivo, NEG: negativo			

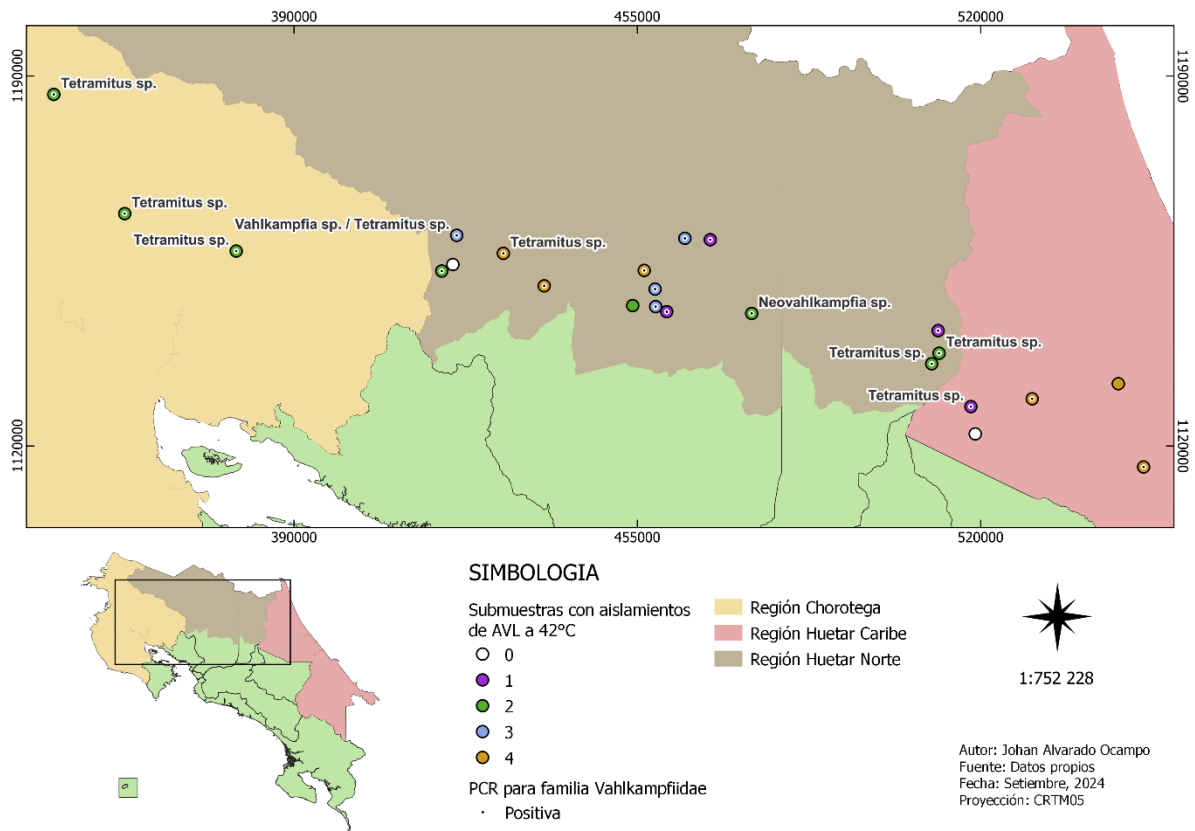


Figura 1. AVL de la familia Vahlkampfiidae aisladas a partir de diferentes cuerpos de agua. Los colores representan el número de submuestras de agua cultivadas a 42 °C positivas (blanco: 0, púrpura: 1, verde: 2, azul: 3, naranja: 4) y el punto negro central es indicativo de PCR para familia taxonómica positiva. La zona amarilla (izquierda) corresponde a la Región Chorotega, la zona café (centro) a la Región Huetar Norte y la roja (derecha) a la Región Huetar Caribe. Elaboración propia.

Encuesta exploratoria CAP sobre la infección por *N. fowleri* y su riesgo

Se aplicaron encuestas en 20 de los 24 sitios de muestreo, a un total de 72 personas: 45 mujeres y 27 hombres, con edades entre los 18-62 años y 18-66 años, respectivamente. La distribución por género y edad se muestra en el Cuadro 2. Un 56,9 % (41; IC 95 %: 45,5-

68,4) no especificó algún mes de preferencia para visitar con fines recreativos los sitios muestreados; sin embargo, marzo y abril fueron los meses más mencionados.

La frecuencia de visitación se puede observar en la Figuras 2. Un 77,8 % (56; IC 95 %: 68,2-87,4) afirma visitar con regularidad, al menos una vez al año, este tipo de sitios para la recreación, y un 61,1 % (44; IC 95 %: 49,9-72,4) declara ser visitante no local de la comunidad en la que se encuentra el cuerpo de agua dulce. La Figura 3 muestra los lugares de procedencia de las personas a las que se les aplicó la encuesta.

Cuadro 2. Frecuencia absoluta y relativa de aspectos sociodemográficos de las personas visitantes de cuerpos de agua dulce para la recreación que fueron encuestadas durante los muestreos en 20 sitios de colecta.

Componente del perfil sociodemográfico	Ha escuchado hablar de <i>Naegleria fowleri</i> o sus nombres vernaculares		Total de personas encuestadas (n = 72)
	SÍ	NO	
	45 (62,5 %)	27 (37,5 %)	
Categoría de género (frec. absoluta)			
Femenino	32	13	45
Masculino	13	14	27
Categoría de género (frec. relativa, %)			
Femenino	44,5	18,0	62,5
Masculino	18,0	19,5	37,5
Grupo de edad en años cumplidos (frec. absoluta)			
18-39	30	15	45
≥ 40	15	12	27
Grupo de edad en años cumplidos (frec. relativa, %)			
18-39	41,7	20,8	62,5
≥ 40	20,8	16,7	37,5
Categoría de procedencia (frec. absoluta)			
GAM	22	9	31
No GAM	21	16	37
Extranjero	2	2	4
Categoría de procedencia (frec. relativa, %)			
GAM	30,5	12,5	43,0
No GAM	29,2	22,2	51,4
Extranjero	2,8	2,8	5,6

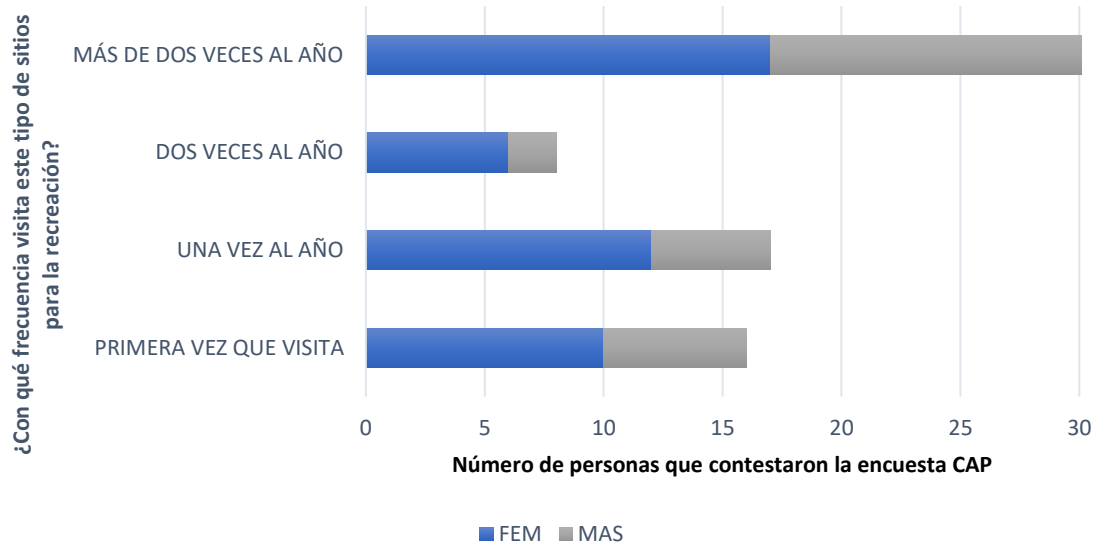


Figura 2. Frecuencia de visitación a cuerpos de agua dulce para la recreación, por género. Elaboración propia.

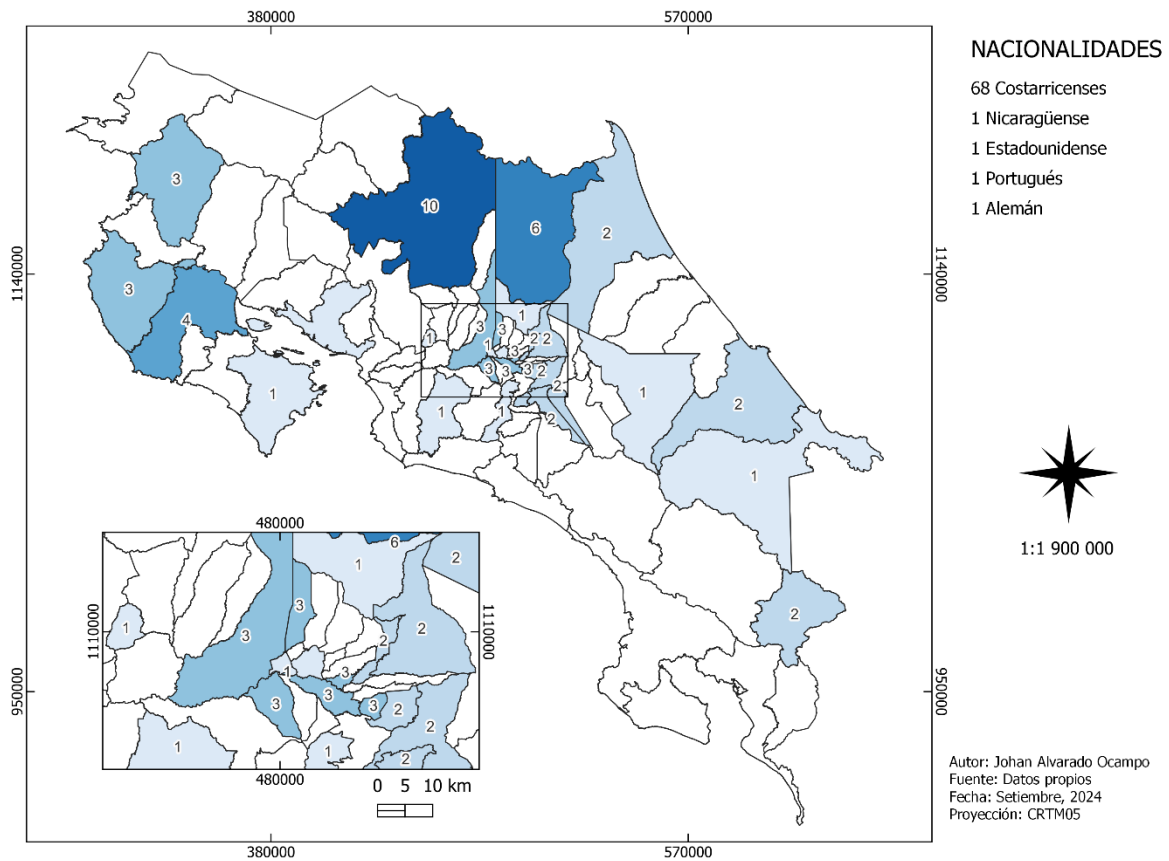


Figura 3. Procedencia de las personas que contestaron la encuesta CAP. El número y la

intensidad del color representan la cantidad de encuestados que declararon cada cantón resaltado como su sitio de residencia. Elaboración propia.

Con relación al rubro de conocimientos, es de destacar que el 62,5 % (IC 95 %: 51,3-73,7) de encuestados ha escuchado sobre *Naegleria fowleri*, también conocida como “ameba comecerebros”, mientras que el 37,5 % (IC 95 %: 26,3-48,7) refirió que no. El porcentaje de respuestas correctas (puntaje de conocimiento) por ítem se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentaje total y desagregado, por ítem de respuestas correctas, para la evaluación de CONOCIMIENTOS sobre la infección por *Naegleria fowleri* en personas visitantes de cuerpos de agua dulce para la recreación.

Conocimiento específico que evalúa el ítem	Acierto general	Desagregación por						
		Género *		Grupo de edad (años)		Procedencia *		
		FEM	MAS	18-39	≥ 40	GAM	No GAM	Extranjero
Ruta de entrada al cuerpo para adquirir la infección	30,6	35,5	22,2	35,5	22,2	38,7	24,3	25,0
Principales manifestaciones clínicas de la infección	36,1	44,4	22,2	35,5	37,0	54,8	24,3	0,0
Frecuencia de casos en el país	37,5	44,4	25,9	37,8	37,0	51,6	27,0	25,0
Severidad de la infección en el ser humano	44,4	57,8	22,2	46,7	40,7	58,1	35,1	25,0
Lugares donde es posible adquirir la infección	30,6	33,3	25,9	33,3	25,9	35,5	27,0	25,0
Puntaje general de conocimientos	35,8	43,1	23,7	37,8	32,6	47,7	27,6	20,0
valor p		< 0,001		0,321		< 0,001		

* χ^2 ($p < 0,05$), prueba de dependencia entre los aciertos y la variable categórica es estadísticamente significativa.

El Escalamiento de Likert de la evaluación de actitudes y prácticas se puede ver en las Figuras 4, 5 y 6, por género, grupo de edad y procedencia. El número absoluto del tipo de respuesta obtenida por ítem se muestra en el consolidado del Cuadro 4.

Se observó una correlación positiva media (rho de Spearman = 0.3571; p = 0,002) entre el puntaje de conocimientos y el puntaje de actitudes. No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre las variables numéricas A-P o C-P, ni asociaciones con las variables categóricas; con excepción de la comparación de las medianas del puntaje de conocimiento entre géneros y entre procedencias (p = < 0,05).

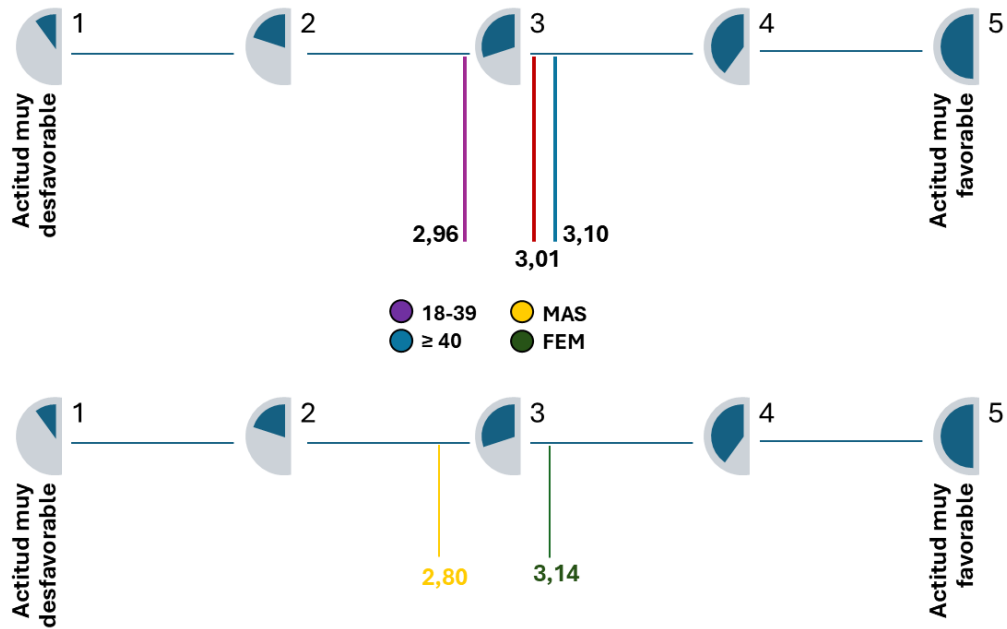


Figura 4. Escalamiento de Likert para evaluación de actitudes con relación a la visitación en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*. La línea roja representa la puntuación general. También se incluyen los valores de puntuación desagregada por grupo de edad (púrpura y azul) y género (amarillo y verde). Elaboración propia.

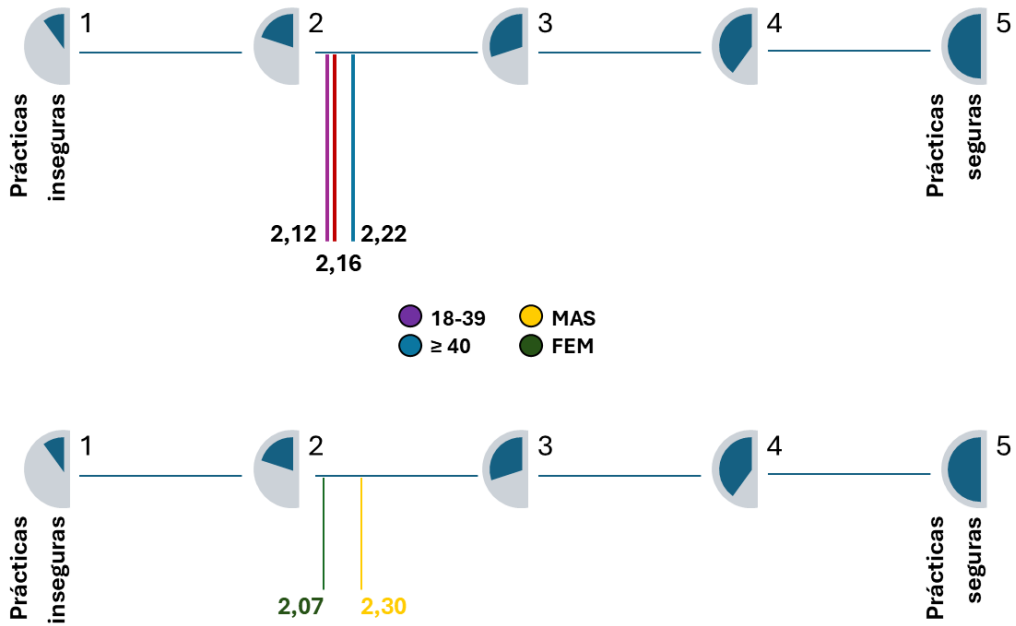


Figura 5. Escalamiento de Likert para evaluación de prácticas con relación a la visita en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*. La línea roja representa la puntuación general. También se incluyen los valores de puntuación desagregada por grupo de edad (púrpura y celeste) y género (amarillo y verde). Elaboración propia.

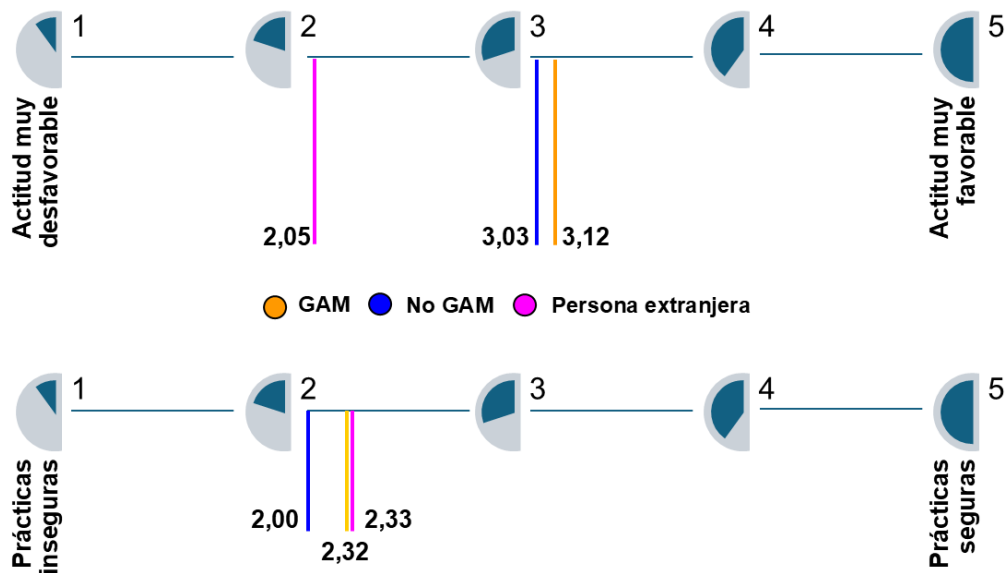


Figura 6. Escalamiento de Likert para evaluación de actitudes y prácticas con relación a la visita en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*. Se incluyen los valores de puntuación desagregada por categoría de procedencia: GAM (naranja), No GAM (azul) y persona extranjera (rosa). Elaboración propia.

Cuadro 4. Frecuencia del tipo de respuesta ofrecida para cada ítem de ACTITUDES y PRÁCTICAS, con relación a la visitación en cuerpos de agua dulce para la recreación y el riesgo de infección por *Naegleria fowleri*.

Valor en la Escala de Likert	Opción de respuesta para cada afirmación	Actitudes				Valor en la Escala de Likert	Opción de respuesta para cada afirmación	Prácticas		
		La infección es un problema importante de salud	Hay preocupación por adquirir la infección	Se presta atención a información relacionada a esta infección	Acude al centro de salud al presentar síntomas relacionados a la infección			Usa naricera al realizar actividades acuáticas	Evita sumergirse o zambullirse cuando no cuenta con naricera	Recomienda a otras personas las medidas de prevención anteriores
5	Totalmente en desacuerdo	5	11	5	9	5	Nunca	58	29	36
4	En desacuerdo	4	5	6	10	4	La mayoría de las veces no	4	3	5
3	Ni de acuerdo ni en desacuerdo	11	11	13	15	3	A veces sí, a veces no	5	10	13
2	De acuerdo	16	11	17	11	2	La mayoría de las veces sí	2	14	5
1	Totalmente de acuerdo	36	34	31	27	1	Siempre	3	16	13
Total de respuestas		72								

DISCUSION

Las AVL de la familia Vahlkampfiidae son microorganismos con gran adaptabilidad a un amplio rango de hábitats (principalmente suelos y sedimentos asociados a cuerpos de agua) y se han hallado en ambientes extremos de salinidad, temperatura y pH ³⁹.

La relevancia de la presencia de este tipo de amebas en cuerpos de agua dulce utilizados para la recreación y el turismo se fundamenta en el estrecho contacto con el ser humano y en la existencia de amebas vahlkámptidas anfitozoicas como *Naegleria fowleri* ⁴⁰. Sin embargo, ha habido reportes aislados que implican a otros miembros de esta familia en procesos patológicos. Por ejemplo, se ha asociado *Vahlkampfia* sp. con casos de queratitis en seres humanos como único hallazgo en cultivo de una biopsia de córnea (presencia de *Acanthamoeba* sp. no demostrada), también presente en muestras ambientales (líquido de lentes de contacto, grifo de baño) relacionadas al caso ⁴¹, o en raspado corneal ⁴².

Se han descrito casos de infecciones mixtas de *Vahlkampfia* sp. y *Acanthamoeba* sp. tras cultivo de lentes de contacto y raspados corneales, en los que no se estableció si el papel de *Vahlkampfia* sp. fue como patógeno primario o como contaminante secundario a la infección por *Acanthamoeba* sp. ^{43,44}. También se ha sugerido el potencial patogénico de otras especies termófilas como *N. australiensis* y *N. italica* en modelos animales ⁴⁵.

En este trabajo se encontró una positividad del 91,7 % por AVL cultivables a 42 °C aisladas a partir de los lugares visitados para muestreo (22/24) con un 83,3 % de positividad en la PCR para familia Vahlkampfiidae en dichos aislamientos (20/24) y un 29,2 % con relación a *Naegleria* spp. (7/24). En el pasado, se han realizado aislamientos de AVL a partir de muestras de aguas recreacionales con frecuencias de 64,0 % ⁴⁶ y de 80,4 % en sedimentos de cuerpos de agua dulce ⁴⁷.

De los 20 cuerpos de agua dulce a partir de los que se lograron cultivar las AVL a 42 °C, en nueve de ellos se identificaron, por secuenciación, aislamientos con porcentajes de identidad altos con *Tetramitus* sp., *Vahlkampfia* sp. y *Neovahlkampfia* sp. Si bien, por PCR se detectó *Naegleria* spp., esto no pudo ser confirmado por secuenciación del amplicón de la PCR-VAHL, posiblemente por la predominancia de material genético de otras AVL que compiten en el hábitat con *Naegleria* spp.^{10,48,49}. Lo mismo sucedió en una encuesta de condiciones ambientales en la República Centroafricana⁵⁰. Sin embargo, en muestras de agua de ríos ya se ha reportado un 0 % de detección de (0/100) de *Naegleria* sp.⁵¹.

En línea con los resultados presentados, un metaanálisis arrojó una prevalencia global de *Vahlkampfia* sp. de 54,2 % (27,5 – 79,7) en piscinas y aguas recreacionales⁵²; y existen numerosos reportes de *Vahlkampfia* sp. y *Naegleria* sp. encontradas en agua de río y agua de plantas de tratamiento⁵³⁻⁵⁷.

Desde el punto de vista del riesgo que puede suponer la presencia de estas amebas en la naturaleza, se debe considerar la presencia de bacterias resistentes a las amebas, que utilizan a las AVL como albergues estratégicos para su permanencia en el entorno; en este sentido, se ha demostrado que *Vahlkampfia* sp. y *Naegleria* spp. aisladas de aguas recreacionales pueden albergar bacterias como *Pseudomonas* sp. y *Escherichia/Shigella*⁵⁸.

También se halló *Neovahlkampfia*, un género descrito inicialmente como de origen marino^{59,60}, que se constituyó junto con una actualización taxonómica hecha al género *Tetramitus* hace relativamente poco tiempo tras la reasignación de varias especies de *Vahlkampfia* (*V. damariscottae*, ahora *Ne. damariscottae*; *V. enterica* y *V. lobospinosa*, ahora *T. entericus* y *T. lobospinosus*) por análisis de las secuencias del ADN ribosomal de

la subunidad pequeña ⁶¹; pues, con anterioridad, todos los vahlkämpfidos que no produjeran formas flageladas se consideraban del género *Vahlkampfia*.

En este muestreo de cuerpos de agua dulce el principal género identificado (8/24) fue *Tetramitus*, grupo en el que se incluyen AVL poco estudiadas, con frecuencias variables a nivel ambiental y que, al igual que en *Naegleria*, hay especies que no exhiben formas flageladas y otras que sí lo hacen ⁶²⁻⁶⁴. Además, comparte aspectos morfológicos con *Naegleria* y, por tal razón, los enfoques basados en morfología pueden asignar mal a miembros de estos géneros; de modo que el análisis de secuencias ITS que incluyan el gen ADNr 5.8S y ADNr 18S es necesario ⁶⁵. Una publicación reciente propone una reclasificación dentro de la clase Heterolobosea que separaría la familia Vahlkampfiidae (incluyendo los géneros *Vahlkampfia* y *Tetramitus*), de Naegleriidae (*Naegleria* spp., *Willaertia* sp.) y Neovahlkampfiidae (*Neovahlkampfia* spp.) ³⁹.

El rango de hábitats y condiciones óptimas para *Tetramitus* sp. es amplio, pues se han descrito hallazgos de amebas de este género con poca movilidad o ausencia de crecimiento a 40 °C o más ^{63,66}, pero también se ha encontrado *Tetramitus* sp. en plantas de tratamiento de agua ⁵⁷, sistemas de suministro de agua ⁶⁷, sedimentos de agua dulce ⁶⁸, compostaje (temperatura: 39,1 °C y pH: 7,6) ⁶⁹, o exhibiendo características francamente termoacidófilas (temperatura: 28-54 °C y pH: 1,2-5) ⁷⁰.

Este trabajo preliminar coincide con otros esfuerzos previos de muestreo de ríos, lagos, pozas y piscinas con resultados que muestran una predominancia (25,0 %) de *Tetramitus* con identidades similares a aislamientos de Australia y EE. UU. por análisis filogenéticos ⁵⁰. En suelos de uso agrícola y de jardín también está presente *Tetramitus* sp., y se han aislado e identificado bacterias patógenas oportunistas (e.g. *P. aeruginosa* trimetoprim/sulfametoxazol-resistente y *Stenotrophomonas maltophilia*) en asociación con estas AVL ⁷¹.

No todas las especies de los géneros aquí identificados son conocidas termofílicas; sin embargo, en este trabajo las amebas se seleccionaron y multiplicaron en cultivo a 42 °C a través de varios pasajes, lo que demuestra su termotolerancia. En la literatura se describen algunos casos de *Vahlkampfia* sp. y *Allovahlkampfia* sp. con termotolerancia a 40 °C y 42 °C, así como cualidades de osmotolerancia⁷². Además, *Vahlkampfia* sp. ha sido aislada de balnearios termales⁷³.

La termotolerancia en *Tetramitus* sp. también ha sido demostrada con aislamientos (a partir de arroyos, ríos, canales, tierra y lodo) a temperaturas máximas de 40 °C⁷⁴ y 42 °C⁷⁵. Esto coincide con la adaptabilidad que demuestran otros vahlkámptidos parásitos conocidos, como *N. fowleri*, y señala que estos entornos acuáticos son permisibles para la presencia de AVL con cualidades patogénicas. En este sentido, se decidió también implementar una herramienta para describir el nivel de conocimiento y características de comportamiento de las personas visitantes de reservorios naturales de agua con fines recreativos, con relación al riesgo de infección por *N. fowleri*.

Se aplicó una encuesta CAP a 72 personas durante los muestreos de agua y sedimento, siendo una mayor proporción de personas entrevistadas: mujeres con un 62,5 % (contra un 37,5 % de hombres), con edades entre los 18 y los 39 años con un 62,5 % (contra un 37,5 % de personas de 40 años o más), con un 61,1 % que refiere no residir en la localidad donde se encuentra el cuerpo de agua (contra un 38,9 % de locales), con visitación regular en un 77,8 % (contra un 22,2 % de visitantes primerizos), y un 56,9 % sin preferencia particular por el momento del año en que se recrea en este tipo de reservorios de agua. La diferencia entre personas provenientes de la GAM (43,1 %) y fuera de la GAM (51,4 %) fue menor, pero importante con relación a las personas extranjeras no residentes en Costa Rica que se encontraron haciendo turismo en los sitios muestreados (5,6 %).

Los antecedentes de encuestas de este tipo con relación a infecciones por AVL son escasos: se han publicado estudios en usuarios de lentes de contacto donde se han dirigido algunas preguntas relacionadas al riesgo de queratitis amebiana, confirmando un buen nivel de conocimiento sobre prácticas preventivas de higiene ^{25,33}. Sobre la meningoencefalitis amebiana primaria, existe una publicación sobre una entrevista de conocimientos aplicada a estudiantes de ciencias de la salud ³¹ y otra tipo CAP aplicada a personal de salud ⁷⁶.

En este caso, la población objetivo fue diferente, dirigiéndose a personas visitantes de cuerpos de agua dulce para recreación. Según la literatura consultada, el único estudio similar a esta propuesta fue una encuesta CAP realizada para la población general de Karachi, Pakistán ⁷⁷ lugar donde se ha considerado la MAP como un evento de gran preocupación desde 2008 pues se han reportado números variables de muertes por año desde entonces ⁷⁸. En el estudio aquí presentado, solamente un 37,5 % de participantes refirió no haber escuchado nunca sobre *Naegleria fowleri*, o bien, la “ameba come cerebros”, lo que incide en el nivel de conocimiento de la población.

Se ha visto, para otras parasitosis desatendidas, que el estado de alerta sobre una infección, su biología, medidas de prevención y control, es insuficiente ⁷⁹. Esto se alinea con la idea de que las experiencias de la vida pueden contribuir a un mejor sentido del autocuidado y prevención; sin embargo, la MAP es una enfermedad que, además de muy letal, es de baja frecuencia en el país, y haberla vivido de cerca resulta difícil en el contexto costarricense.

El puntaje de conocimiento, operativizado como el porcentaje de aciertos, muestra un nivel inapropiado de manejo de la información relacionada al tema de interés, pues ninguno de los ítems teóricos supera el 45,0 % y el global es de 35,8 %. Adicionalmente, al analizar la desagregación por género y procedencia se encontraron diferencias significativas, con mejores puntajes de conocimiento para las mujeres y las personas

provenientes de la GAM. Reforzando la idea ya expuesta, un estudio CAP sobre esquistosomiasis señala que las personas que han padecido o conocen a alguien que ha padecido la enfermedad o han participado en intervenciones de salud relacionadas poseen mejores puntuaciones CAP ⁸⁰.

Sobre las diferencias entre hombres y mujeres, hay que señalar que históricamente las mujeres han tenido un cuidado de la salud más exhaustivo; esto se puede explicar por niveles más elevados de alfabetización en salud que resultan de: i) una mejor exploración del sistema de salud y ii) roles de género tradicionales sobre el cuidado familiar basados en expectativas que les han obligado a poseer un mejor conocimiento base ⁸¹. Según National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine ⁸², las mujeres utilizan más los servicios de salud que los hombres, pero también realizan más visitas de atención primaria, reciben más diagnósticos, servicios de tamizaje y acompañamiento nutricional y de salud sexual. Sin embargo, la percepción del riesgo en el hombre puede modular qué tan proclive es a buscar información, según Manierre ⁸³.

Por otra parte, la variable de conocimiento fue notoriamente peor puntuada en personas procedentes de fuera de la GAM, relacionándose esto con zonas preferentemente rurales del país. Aunque se ha sugerido que el efecto de disparidad urbano-rural puede verse incrementado en países en desarrollo debido a la disponibilidad de recursos de salud y no se debe completamente a la ruralidad *per se* ⁸⁴, la dicotomía urbano-rural desfavorece a la ruralidad con menor acceso a servicios de salud, a fuentes de información en salud y menos opciones de proveedores de salud, siendo, a su vez, determinadas por características como el ingreso económico y la educación de estas poblaciones ^{82,85}.

Asimismo, no se debe descartar que estas variables, así como la edad y el género, confundan la interpretación sobre diferencias en alfabetización en salud entre residentes urbanos y rurales cuando no se ajustan las estimaciones considerando todas las

covariables ⁸⁴. Hay que considerar que las habilidades que tenga una población para acceder y asimilar educación en salud no necesariamente se traducen en obtener conocimiento suficiente sobre una enfermedad específica y esta brecha se relaciona con acceso a información especializada, a especialistas en el área y experiencias personales ⁸⁴, lo que podría darse en el caso de la MAP por ser un fenómeno relativamente emergente.

Con relación a los puntajes de actitudes y prácticas, los resultados muestran actitudes desfavorecedoras y prácticas de riesgo con niveles de medio a alto (3,01/5,00 y 2,16/5,00, respectivamente). Si bien no hubo diferencias por género o edad en las prácticas o actitudes, poniendo en perspectiva que la mayor parte de participantes fueron personas entre 18 y 39 años, hay que considerar que el grupo demográfico que se ha propuesto como más expuesto a la MAP por epidemiología ha sido el de varones jóvenes ^{2,86,87}, en quienes se presume que hay mayor propensión a realizar acciones que faciliten la entrada forzosa de agua por la nariz, como brincar, bucear o salpicar, que facilitan la invasión de la ameba. También se asocian con mayor permanencia en el agua, realizando actividades que remueven el sedimento que puede contener a *N. fowleri* ^{40,87}. En este sentido, el uso de protectores para la nariz y mantener la cabeza fuera del agua son medidas de prevención ya conocidas y difundidas ⁸⁸.

De acuerdo con estos resultados, el uso de naricera durante las actividades acuáticas es la práctica menos implementada y hubo mayor variabilidad de respuestas en la práctica de zambullirse o sumergirse durante las actividades acuáticas. Un componente que podría explicar la puntuación de prácticas es el hecho de que pareciera que las personas relacionan la ameba más con aguas termales, un concepto errado puesto que, aunque las altas temperaturas favorecen la proliferación de la ameba, hay vasta evidencia de casos relacionados con fuentes de agua de diferente origen y naturaleza como lagos, ríos, balnearios, canales, charcos, entre otros ^{12,86,87}.

Las actitudes evaluadas con más variedad de respuestas fueron la preocupación por enfermarse y la asistencia a centros de salud ante sintomatología relacionada con la infección. Se esperaba que las personas tuvieran mejores prácticas y actitudes a medida que fuera mejor su conocimiento y entendimiento sobre la MAP, aunque el conocimiento y las prácticas no siempre correlacionan, según el contexto, pues pueden mediar determinantes que limitan el accionar adecuado; por ejemplo, cuando no hay acceso a recursos para ejecutar prácticas preventivas o de promoción de la salud ^{89,90}.

La única correlación media encontrada fue entre el conocimiento y la actitud, que se puede asociar a creencias moldeadas a partir de la comprensión del fenómeno. Este resultado no es de extrañar siendo que la mayor proporción de personas saben de la existencia de *N. fowleri*, lo que también podría ser resultado de las comunicaciones emitidas por el Ministerio de Salud de Costa Rica en 2020 cuando se sugirieron acciones preventivas como la prohibición de trampolines, la limpieza de piscinas y rotulación para prevenir y advertir de la posible presencia de la ameba ⁹¹⁻⁹³.

La contextualización de estos comunicados se dio alrededor de centros recreativos de agua termal; por lo que se considera que el mensaje sesgó a la población e invisibilizó otras fuentes potenciales (como las incluidas en este trabajo, en las que se demostró la presencia de otras AVL termotolerantes) y esto puede influir en los hallazgos en prácticas y actitudes. Yoder et al. ⁸⁷ señalan que la rotulación de alerta en ciertos lugares puede crear confusión y hace pensar que la falta de señalización en otros cuerpos de agua significa que están libres del patógeno.

La encuesta CAP aplicada permitió detectar vulnerabilidades de la población con relación al poco conocimiento y comportamiento de riesgo para adquirir la infección por *N. fowleri*. Estos hallazgos coinciden con el trabajo de Younus et al. ⁷⁷, que reportaron un 80,0 % de personas que no habían escuchado nunca sobre el patógeno, más de un 95,0 % de

respuestas incorrectas al abordar el conocimiento y casi un 100,0 % que no evita actividades acuáticas durante el verano o no previene la entrada de agua por la nariz de ninguna forma.

Los resultados de este estudio enfrentan limitaciones de representatividad por la selección no probabilística de las fuentes de agua y el número de fuentes que se logró muestrear en total; asimismo, el número de personas que respondieron a la encuesta CAP limita la generalización de los hallazgos, pero permite trazar una base con la que hasta el momento no se contaba.

Si bien la formulación de preguntas fue cuidadosa y se revisaron de previo a su implementación, hay sesgos de información inherentes a la aplicación de una encuesta y difíciles de controlar, por lo que se deben considerar principalmente aquellos provenientes de las personas como los sesgos de memoria, cortesía, afirmación y de contexto, en respuesta a presiones externas del entorno social en el que las personas viven o se encontraban al momento de ser encuestadas. Al no poder descartar subestimaciones o sobreestimaciones en los puntajes CAP, los resultados se plantean como desencadenantes de nuevas hipótesis que puedan confirmarse eventualmente por medio de estudios posteriores de mayor envergadura.

Los resultados de este estudio apuntan a que las AVL vahlkämpfidas, como microorganismos de amplia distribución, son aisladas fácilmente del ambiente, y hay una alta frecuencia de *Tetramitus* spp. termotolerantes en aguas superficiales no termales en Costa Rica con capacidad de proliferar a altas temperaturas, similar a lo que ocurre en el caso de *N. fowleri*⁴⁰.

Mientras que la encuesta CAP, una herramienta para dilucidar lo que es sabido, creído y puesto en marcha en el contexto del riesgo de infección por *N. fowleri* refuerza la

importancia y necesidad de más y mejor educación en salud, pues no se consigue un buen grado de conocimiento y la muestra estudiada evidencia deficiencias en el manejo y prevención del riesgo. Las brechas se deben cerrar con estrategias de comunicación y publicidad a través de medios tradicionales y redes sociales, en cooperación estratégica con la academia, proveedores de salud, autoridades en salud ambiental y recurso hídrico, y otras organizaciones relacionadas con la salud pública ⁷⁸.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Al tratarse de una encuesta de CAP de aplicación a seres humanos, se realizó la consulta ante el Comité Ético Científico (CEC) de la UCR, órgano que declaró el proyecto como exento de revisión mediante oficio CEC-414-2023. Asimismo, se obtuvo permiso de acceso a elementos de la biodiversidad de la Comisión Institucional de Biodiversidad (CBio) de la UCR, según establece la normativa nacional, mediante oficio CBio-15-2023.

El autor declara no tener conflictos de interés con relación al trabajo presentado.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se enmarca en un proyecto de investigación que fue seleccionado para recibir apoyo económico de la Beca para Investigación Científica Dra. Luz Claudio - Mount Sinai Scientific Scholarship “International Training in Environmental Health over the Lifespan” del programa de colaboración entre la UNA y la Icahn School of Medicine at Mount Sinai de Nueva York, razón por la cual se contó con los fondos de este galardón para la ejecución del proyecto.

El trabajo se desarrolló en el marco del proyecto C-3513, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la UCR y adscrito al CIET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 1966;1473–6. doi: 10.1056/NEJM196606302742605.
2. Gharpure R, Bliton J, Goodman A, Ali IKM, Yoder J, Cope JR. Epidemiology and Clinical Characteristics of Primary Amebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: A Global Review. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73: E19–27. doi.org/10.3201/eid2701.202119.
3. Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. En: Garcia HH, Tanowitz HB, del Brutto OH (Eds.). *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2013. ISBN 9780128018934.
4. Güémez A, García E. Primary amoebic meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and treatments. *Biomolecules*; 2021;11. doi: 10.3390/biom11091320.
5. Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Soc Microbiol; 2015;59:6677–81. doi: 10.1128/AAC.01293-15.
6. Carter R. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol*. 1970;100(4):217–44. doi: 10.1002/path.1711000402.
7. Carter RF. Primary amoebic meningo-encephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J Pathol Bacteriol*. 1968;96(1). doi: 10.1002/path.1700960102.
8. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Br Med J*. 1965;739–40. doi: 10.1136/bmj.2.5464.734-a.

9. Ekici A, Alkan S, Aydemir S, Gurbuz E, Unlu AH. Trends in *Naegleria fowleri* global research: A bibliometric analysis study. *Acta Trop.* 2022;234. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106603.
10. Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? *Trends Parasitol.* 2020;36. p. 19–28. doi: 10.1016/j.pt.2019.10.008.
11. Matanock A, Mehal JM, Liu L, Blau DM, Cope JR. Estimation of Undiagnosed *Naegleria fowleri* Primary Amebic Meningoencephalitis, United States. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(1):162–4. doi: 10.1093/jpids/piu103.
12. Gharpure R, Gleason M, Salah Z, Blackstock AJ, Hess-Homeier D, Yoder JS, et al. Geographic range of recreational water-associated primary amebic meningoencephalitis, United States, 1978-2018. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(1):271–4. doi: 10.3201/eid2701.202119.
13. Saberi R, Seifi Z, Dodangeh S, Najafi A, Abdollah Hosseini S, Anvari D, et al. A systematic literature review and meta-analysis on the global prevalence of *Naegleria* spp. in water sources. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2020;67:2389–402. doi: 10.1111/tbed.13635.
14. Abrahams-Sandí E, Retana-Moreira L, Castro-Castillo A, Reyes-Battle M, Lorenzo-Morales J. Fatal Meningoencephalitis in Child and Isolation of *Naegleria fowleri* from Hot Springs in Costa Rica. *Emerging Infect Dis.* 2015;21(2):382–4. doi: 10.3201/eid2102.141576.
15. Retana Moreira L, Zamora Rojas L, Grijalba Murillo, Molina Castro SE, Abrahams Sandí E. Primary amebic meningoencephalitis related to groundwater in Costa Rica: Diagnostic confirmation of three cases and environmental investigation. *Pathogens.* 2020;9(8):1–9. doi: 10.3390/pathogens9080629.
16. Johnson RO, Cope JR, Moskowitz M, Kahler A, Hill V, Behrendt K, et al. Primary Amebic Meningoencephalitis Associated with Exposure to Swimming Pool Water

- Supplied by an Overland Pipe - Inyo County, California, 2015. Vol. 54, Clin Infect Dis. 2012. doi: 10.1093/cid/cir961.
17. Harris GR, Karmarkar EN, Quenelle R, Chaille L, Madhok J, Tien V, et al. Death from Primary Amebic Meningoencephalitis after Recreational Water Exposure during Recent Travel to India-Santa Clara County, California, 2020. Open Forum Infect Dis. 2021;8(8). doi: 10.1093/ofid/ofab322.
 18. Cope JR, Murphy J, Kahler A, Gorbett DG, Ali I, Taylor B, et al. Primary amebic meningoencephalitis associated with rafting on an artificial whitewater river: Case report and environmental investigation. Clin Infect Dis. 2018;66(4):548–53. doi: 10.1093/cid/cix810.
 19. Hamaty E, Faiek S, Nandi M, Stidd D, Trivedi M, Kandukuri H. A Fatal Case of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Recreational Waters. Case Rep Crit Care. 2020;2020. doi: 10.1155/2020/9235794.
 20. Van den Diressche E, Vandepitte J, van Dijck PJ, de Jonckheere J, van de Voorde H. Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water. Lancet. 1973. doi: 10.1016/s0140-6736(73)92634-2.
 21. López Jiménez MA, Monks S, Serrano A, Pulido Flores G, Gaytan Oyarzun JC, López Ortega M. Dinámica de las variables fisicoquímicas del sedimento de la laguna de Tampamachoco, Veracruz, México Dynamics of sediment physico-chemical variables of Lake Tampamachoco, Veracruz, Mexico. Revista Científica UDO Agrícola. 2012;12(4):965–72. Disponible en: dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6104332
 22. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F. Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. Parasitol Res. 2007;100(6):1249–56. doi: 10.1007/s00436-006-0399-1.

23. Sykora, JL, Keleti G, Martinez, AAJ. Occurrence and Pathogenicity of *Naegleria fowleri* in Artificially Heated Waters. Vol. 45, Applied Environ Microbiol. 1983. doi: 10.1128/aem.45.3.974-979.1983.
24. Andrade C, Menon V, Ameen S, Kumar Praharaj S. Designing and Conducting Knowledge, Attitude, and Practice Surveys in Psychiatry: Practical Guidance. Indian J Psychol Med. 2020;42(5):478–81. doi: 10.1177/0253717620946111.
25. Shaik R, Samanthula BS, Pulivarthi SK, Adusumilli PK. Knowledge, Attitude and Practice of Contact Lens Users among South Indian Population. Indian J Pharm Practice. 2021;14(4):239–44. doi: 10.5530/ijopp.14.4.50.
26. Aplitop - Land Surveying & Civil Engineering Solutions. Software topográfico para GPS TcpGPS 2.5. 2023. <https://www.aplitop.com/software/tcp-gps>
27. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Baird RB, Eaton AD, Rice EW (Eds.). 2017. 1–1546 p.
28. Lares-Villa F, Hernández-Peña C. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). Exp Parasitol. 2010;126(1):33–6. doi: 10.1016/j.exppara.2010.04.011
29. Alvarado-Ocampo J, Abrahams-Sandí E, Romero-Zúñiga JJ, Córdoba Gamboa L. Caracterización fisicoquímica y geoambiental de cuerpos de agua dulce con capacidad para albergar y favorecer la presencia amebas de vida libre potencialmente patógenas. Rev Salud Ambiental. 2025.
30. De Jonckheere JF, Brown S. The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. Protist. 2005 Jun 17;156(1):89–96. doi: 10.1016/j.protis.2004.11.001.
31. Shakeel S, Iffat W, Khan M. Pharmacy Students' Knowledge Assessment of *Naegleria fowleri* Infection. Scientifica (Cairo). 2016;2016. doi: 10.1155/2016/2498283

32. Programa regional de acción y demostración de alternativas sostenibles para el control del vector de la malaria sin el uso de DDT en América Central y México: Programa regional “salud de los pueblos indígenas de Las Américas.” Encuesta sobre Conocimientos, Actitudes y Prácticas (CAP): Una herramienta para el abordaje intercultural de la malaria. 2008.
33. Mahittikorn A, Kittichathanakul T, To-Im J, Nacapunchai D. Knowledge, Behavior, and Free-Living Amoebae Contamination of Cosmetic Contact Lens Among University Wearers in Thailand: A Cross-Sectional Study. *Eye Contact Lens*. 2017;43(2):81–8. doi: 10.1097/ICL.0000000000000246.
34. Likert R. A technique for the measurement of attitudes. *Archives of Psychology*. 1932;22 140(55).
35. Hernández-Sampieri, Mendoza Torres. Recolección de los datos en la ruta cuantitativa. En: *Metodología de la investigación Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2018. p. 1–713.
36. Martín Ruiz, J-F. Los factores definitorios de los grandes grupos de edad de la población: tipos, subgrupos y umbrales. *Geo Crítica / Scripta Nova*. Revista electrónica de geografía y ciencias sociales. 2005;9(190). Disponible en: <http://www.ub.es/geocrit/sn/sn-190.htm>
37. Plan GAM 2013-2030 Actualización del Plan Regional de la Gran Área Metropolitana. N° 38334-PLAN-MINAE-MIVAH-MOPT-S-MAG. Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=77104&nValor3=96513&strTipM=TC
38. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 14*. 2015. College Station, TX: StataCorp LLC.
39. Pánek, T., & Čepička, I. Diversity of Heterolobosea. 2012. InTech Open. <https://www.intechopen.com/chapters/28886>

40. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004;34: 1001–27. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004.
41. Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal D V. Amebic Keratitis in a Wearer of Disposable Contact Lenses due to a Mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* Infection. *Ophthalmology.* 1996;103. doi: 10.1016/s0161-6420(96)30667-2
42. Alexandrakis G, Miller D, Huang AJW. Amebic Keratitis Due to *Vahlkampfia* Infection Following Corneal Trauma. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(7):950–951. doi:
43. Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebbali M, et al. First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Exp Parasitol.* 2010;126(1):89–90. doi: 10.1016/j.exppara.2009.10.009
44. Arnalich-Montiel F, Lorenzo-Morales J, Irigoyen C, Morcillo-Laiz R, López-Vélez R, Muñoz-Negrete F, Piñero JE, Valladares B. Co-isolation of *Vahlkampfia* and *Acanthamoeba* in *Acanthamoeba*-Like Keratitis in a Spanish Population. *Cornea.* 2013, 32(5):608-614. doi: 10.1097/ICO.0b013e31825697e6
45. De Jonckheere JF. A Century of Research on the Amoeboflagellate Genus *Naegleria*. In *Acta Protozool.* 2002;41
46. Niyiyati M, Saberi R, Lorenzo-Morales J, Slaehi R. High occurrence of potentially-pathogenic free-living amoebae in tap water and recreational water sources in South-West Iran. *Tropical Biomedicine.* 2016;33(1):95-101.
47. Mussengue Chaúque BJ, Borella da Silva TC, Leal dos Santos D, Brittes Benitez G, Henriques Chaúque LG, Domingues Benetti A, et al. Global prevalence of free-living amoebae in solid matrices – A systematic review with meta-analysis. *Acta Trop.* 2023;247. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.107006

48. Griffin JL. The Pathogenic Amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. Environmental Isolations, Competitors, Ecologic Interactions, and the Flagellate-Empty Habitat Hypothesis. J Protozool. 1983;30(2):403-409. doi: 10.1111/j.1550-7408.1983.tb02939.x.
49. Stahl LM, Olson JB. Environmental abiotic and biotic factors affecting the distribution and abundance of *Naegleria fowleri*. FEMS Microbiol Ecol. 2021;97. doi: 10.1093/femsec/fiaa238.
50. Farra A, Bekondi C, Tricou V, Mbecko JR, Talarmin A. Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: Epidemiological and molecular aspects. Pan African Medical Journal. 2017;26. doi: 10.11604/pamj.2017.26.57.9021
51. Kao, PM., Tung, MC., Hsu, BM. et al. Quantitative detection and identification of *Naegleria* spp. in various environmental water samples using real-time quantitative PCR assay. Parasitol Res. 2013;112:1467–1474. doi: 10.1007/s00436-013-3290-x
52. Mussengue Chaúque BJ, Leal dos Santos D, Anvari D, Brittes Rott M. Prevalence of free-living amoebae in swimming pools and recreational waters, a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res. 2022;121(11):3033–50. doi: 10.1007/s00436-022-07631-3
53. Bonilla-Lemus P, Caballero Villegas AS, Carmona Jiménez J, Lugo Vázquez A. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. Exp Parasitol. 2014;145(S):S28–33. doi: 10.1016/j.exppara.2014.07.001
54. Ardekan AP, Niyati M, Saberi R, Farahani LZ, Fatemi M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* species and Vahlkampfiidae in the harsh environmental conditions in the centre of Iran. J Water Health. 2023;21(10):1572–9. doi: 10.2166/wh.2023.203

55. Ramirez E, Robles E, Martinez B, Ayala R, Sainz G, Martinez ME, et al. Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Exp Parasitol*. 2014;145(S):S34–8. doi: 10.1016/j.exppara.2014.07.006
56. El-Badry AA, Aufy SM, El-Wakil ES, Rizk EM, Mahmoud SS, Taha NY. First identification of *Naegleria* species and *Vahlkampfia ciguana* in Nile water, Cairo, Egypt: Seasonal morphology and phylogenetic analysis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020;53(2):259–65. doi: 10.1016/j.jmii.2018.06.003
57. Andalib S, Mohammad Rahimi H, Niyayati M, Shalileh F, Nemati S, Rouhani S, et al. Free-living amoebae in an oil refinery wastewater treatment facility. *Science of the Total Environment*. 2022;839. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156301
58. Delumeau A, Quéstel I, Harnais F, Sellin A, Gros O, Talarmin A, et al. Bacterial microbiota management in free-living amoebae (Heterolobosea lineage) isolated from water: The impact of amoebae identity, grazing conditions, and passage number. *Science of the Total Environment*. 2023;900. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165816
59. De Jonckheere JF, Murase J, Opperdoes FR. A New Thermophilic Heterolobosean Amoeba, *Fumarolamoeba ceborucoi*, gen. nov., sp. nov., isolated Near a Fumarole at a volcano in Mexico. *Acta Protozool*. 2011;50,1,41-48. Disponible en: <https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:163488>
60. Tymi, T., Lares-Jiménez, L. F., Kostka, M., & Dyková, I. *Neovahlkampfia nana* n. sp. reinforcing an underrepresented subclade of Tetramitida, Heterolobosea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2016;64,78–87. doi: 10.1111/jeu.12341
61. Brown S, De Jonckheere JF. A Reevaluation of the Amoeba Genus *Vahlkampfia* Based on SSUrDNA Sequences. *Europ J Protistol* 1999;35:49–54. doi: 10.1016/S0932-4739(99)80021-2

62. Lee HB, Park JS. Characterizations of four freshwater amoebae including opportunistic pathogens newly recorded in the Republic of Korea. *J Ecol Environ.* 2023;47. doi: 10.5141/jee.23.030
63. De Jonckheere JF, Brown S. The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist.* 2005;156(1):89–96. doi: 10.1016/j.protis.2004.11.001
64. Green DH, Rad-Menéndez C. The genome sequence of the Heterolobosean amoeboflagellate, *Tetramitus jugosus* CCAP 1588/3C. *Wellcome Open Res.* 2023;8. doi: 10.12688/wellcomeopenres.20189.1
65. De Jonckheere JF. Molecular Definition and the Ubiquity of Species in the Genus *Naegleria*. *Protist.* 2004; 155:89–103. doi: 10.1078/1434461000167.
66. Park JS. A new heterolobosean amoeboflagellate, *Tetramitus dokdoensis* n. sp., isolated from a freshwater pond on Dokdo Island in the East Sea, Korea. *J Eukaryot Microbiol.* 2017;64(6):771-8. doi: 10.1111/jeu.12409.
67. Valčiņa O, Pūle D, Mališevs A, Trofimova J, Makarova S. Co-occurrence of free-living amoeba and legionella in drinking water supply systems. *Medicina (Lithuania).* 2019;55(8). doi: 10.3390/medicina55080492
68. Robinson BS, De Jonckheere JF, Dobson PJ. Two new *Tetramitus* species (Heterolobosea, Vahlkampfiidae) from cold aquatic environments. *Eur J Protistol.* 2007;43(1):1–7. doi: 10.1016/j.ejop.2006.08.001
69. Conza L, Pagani SC, Gaia V. Presence of *Legionella* and Free-Living Amoebae in Composts and Bioaerosols from Composting Facilities. *PLoS One.* 2013;8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0068244
70. Baumgartner, M., Eberhardt, S., de Jonckheere, J.F., Stetter, K.O. *Tetramitus thermacidophilus* n. sp., an amoeboflagellate from acidic hot springs. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2009;56(2), 201–206. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00390.x.

71. Denet, E., Coupat-Goutaland, B., Nazaret, S. et al. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitol Res.* 2017;116: 3151–3162. doi: 10.1007/s00436-017-5632-6
72. Nageeb MM, Eldeek HEM, Attia RAH, Sakla AA, Alkhalil SS, Farrag HMM. Isolation and morphological and molecular characterization of waterborne free-living amoebae: Evidence of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and Vahlkampfiidae in Assiut, Upper Egypt. *PLoS One.* 2022;17. doi: 10.1371/journal.pone.0267591
73. Penas-Ares, M., Paniagua-Crespo, E., Madriñan-Choren, R. et al. Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in N.W. Spain. *Water Air Soil Pollut* 1994;78:83–90. doi: 10.1007/BF00475670
74. De Jonckheere JF. Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). *Eur J Protistol.* 2007;43(1):9–15. doi: 10.1016/j.ejop.2006.09.001
75. De Jonckheere JF, Brown S, Walochnik J, Aspöck H, Michel R. Morphological investigation of three *Tetramitus* spp. which are phylogenetically very closely related: *Tetramitus horticolus*, *Tetramitus russelli* n. comb. and *Tetramitus pararusselli* n. sp. *Eur J Protistol.* 2005;41(2):139–50. doi: 10.1016/j.ejop.2004.12.001
76. Mirza H, Mansoor A, Zil-E-Ali F, Shafiq Butt H, Arif M, Waseem HM. Young Doctors' Knowledge, Attitudes, and Practice regarding *Naegleria fowleri* in a local tertiary care hospitals of Lahore. *PJMHS.* 2019;13(1). doi: 10.1177/09727531231196
77. Younus S, Fatima H, Rangwala BS, Munir A, Ahsan SM, Naeem W, et al. Knowledge, Attitude, and Practices related to *Naegleria fowleri* Among General Population of Karachi, Pakistan: A Cross-Sectional Study. *Ann Neurosci.* 2023. doi: 10.1177/09727531231196

78. Nadeem A, Malik IA, Afridi EK, Shariq F. *Naegleria fowleri* outbreak in Pakistan: unveiling the crisis and path to recovery. *Frontiers in Public Health*. 2023;11. doi: 10.3389/fpubh.2023.1266400
79. Riaz S, Ahmed H, Kiani S, Afzal M, Simsek S, Celik F, et al. Knowledge, attitudes and practices related to neglected tropical diseases (schistosomiasis and fascioliasis) of public health importance: A cross-sectional study. *Front Vet Sci*. 2023;10(1088981). doi: 10.3389/fvets.2023.1088981
80. Dos Santos AJ, Lima SVMA, Sousa AFL de, Vasconcelos dos Santos A, Santos IG de A, Bezerra Santos M, et al. Knowledge, Attitude and Practices towards the Prevention of Schistosomiasis Mansoni in an Endemic Area of Alagoas, Northeast Brazil. *Trop Med Infect Dis*. 2023;8(1). doi: 10.3390/tropicalmed8010034
81. Lee HY, Lee J, Kim NK. Gender Differences in Health Literacy Among Korean Adults: Do Women Have a Higher Level of Health Literacy Than Men? *Am J Mens Health*. 2015;9(5):370–9. doi: 10.1177/1557988314545485
82. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Health-Care Utilization as a Proxy in Disability Determination. Washington (DC): National Academies Press (US). *Factors That Affect Health-Care Utilization*. 2018;2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500097/>
83. Manierre MJ. Gaps in knowledge: Tracking and explaining gender differences in health information seeking. *Soc Sci Med*. 2015;128:151–8. doi: 10.1016/j.socscimed.2015.01.028
84. Aljassim N, Ostini R. Health literacy in rural and urban populations: A systematic review. *Patient Educ Couns*. 2020;103(10):2142–54. doi: 10.1016/j.pec.2020.06.007
85. Chen X, Orom H, Hay JL, Waters EA, Schofield E, Li Y, et al. Differences in Rural and Urban Health Information Access and Use. *Journal of Rural Health*. 2019;35(3):405–17. doi: 10.1111/jrh.12335

86. Ahmad Zamzuri M 'Ammar I, Abd Majid FN, Mihat M, Ibrahim SS, Ismail M, Abd Aziz S, et al. Systematic Review of Brain-Eating Amoeba: A Decade Update. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023;20. doi: 10.3390/ijerph20043021
87. Yoder JS, Eddy BA, Visvesvara GS, Capewell L, Beach MJ. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol Infect*. 2010;138(7):968–75. doi: 10.1017/S0950268809991014
88. Graciaa D, Cope J, Roberts V, Cikesh B, Kahler A, Vigar M, et al. Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff (Weekly) MMWR Editorial Board Outbreaks Associated with Untreated Recreational Water — United States, 2000–2014. Report. 2018;67 Jun. Disponible en: <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/rec-water-tables-figures.html>.
89. Launiala A. How much can a KAP survey tell us about people's knowledge, attitudes and practices? Some observations from medical anthropology research on malaria in pregnancy in Malawi Background: KAP surveys. *Anthropology Matters Journal*. 2009;11. doi: 10.22582/am.v11i1.31
90. Anyolitho MK, Poels K, Huyse T, Tumusiime J, Mugabi F, Tolo CU, et al. Knowledge, attitudes, and practices regarding schistosomiasis infection and prevention: A mixed-methods study among endemic communities of western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(2). doi: 10.1371/journal.pntd.0010190
91. Ministerio de Salud. Exigen rotulación de advertencia, altura máxima y prohibición de toboganes que desboquen en aguas termales. Ministerio de Salud. 2020 Feb 14. Disponible en: [ministeriodesalud.go.cr /index.php/prensa](http://ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa)
92. Ministerio de Salud. Confirmado extraño caso de Meningitis amebiana primaria en joven de 15 años. Ministerio de Salud. 2020 Jan 7. Disponible en: [ministeriodesalud.go.cr /index.php/prensa](http://ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa)

93. Ministerio de Salud. Autoridades aclaran que no estamos en alerta sanitaria por meningitis amebiana. Ministerio de Salud. 2020 Feb 20. Disponible en: [ministeriodesalud.go.cr /index.php/prensa](http://ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa)

CONCLUSIONES

Los trabajos presentados como parte de esta tesis se derivan de un proyecto de monitoreo ambiental de cuerpos de agua dulce naturales en Costa Rica, que responde a una necesidad de describir variables que puedan explicar la presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas para el ser humano e identificar territorios nosogénicos que cuenten con las características necesarios para albergar al microorganismo y servir de fuente para el contacto con el ser humano. El enfoque priorizó la búsqueda de *Naegleria fowleri*, agente etiológico de una de las infecciones más letales: la meningoencefalitis amebiana primaria, cuadro clínico que se ha presentado en el país y que están epidemiológicamente relacionados con las Regiones Chorotega, Huetar Caribe y Huetar Norte. Las siguientes son las principales conclusiones del proyecto:

- a) La presencia de *N. fowleri* en cuerpos de agua dulce naturales de Costa Rica no fue demostrada directamente; sin embargo, se brindaron argumentos ecológicos que sustentan la dificultad para aislar a esta especie debido a una estructura compleja de la comunidad en la que se ve inmersa. En este sentido, es posible sugerir, de manera general, que los cuerpos de agua incluidos en este trabajo poseen características ambientales (en agua, sedimento y clima) adecuadas para la permanencia de AVL.
- b) Se demuestra la presencia de AVL de la familia Vahlkampfiidae por medio de métodos moleculares de detección a partir de los aislamientos positivos a 42 °C: predomina *Tetramitus* sp., seguido de *Vahlkampfia* y *Neovahlkampfia* sp. identificadas por secuenciación; y *Naegleria* spp. por detección basada en PCR. Esto también indica la presencia de AVL termotolerantes en aguas superficiales no

termales en Costa Rica con capacidad de proliferar a altas temperaturas, similar a lo que ocurre en el caso de *N. fowleri*.

- c) La presencia de *Naegleria* spp. en los cuerpos de agua estudiados es independiente de los parámetros fisicoquímicos medidos en el agua y los sedimentos, la caracterización geoespacial de uso de suelo alrededor de los cuerpos de agua y la subregión climática en la que se encuentra, de acuerdo con las medidas epidemiológicas probadas (OR). Aunque esto puede explicarse por la variabilidad de los parámetros medidos y el número limitado de sitios incluidos, la propuesta es la primera en su tipo al hacer caracterizaciones ambientales completas en lugares que efectivamente funcionan como hábitats de AVL en Costa Rica, coincidiendo los hallazgos con reportes previos en la literatura.

- d) La encuesta CAP demuestra que la población turista/visitante local encuestada posee un conocimiento deficiente sobre la MAP y su agente etiológico, a la vez que no reconoce a cabalidad el riesgo que representan los sitios recreativos muestreados, no aplica las medidas de prevención a tomar para evitar la MAP y desconoce sobre prevención. Los hombres y las personas procedentes de fuera de la GAM parecen arrastrar más desinformación o ausencia de información del todo sobre el evento.

RECOMENDACIONES

Es importante interpretar con cautela los hallazgos de esta investigación y hacerlo a la luz de comprender que el proyecto, como estudio transversal, conlleva una serie de limitaciones que comprometen la generalización de los resultados. Por ello, las siguientes son las principales recomendaciones metodológicas que se desprenden para proyectos subsiguientes, en la medida en que el recurso financiero y logístico lo permita:

- a) Definir el marco muestral de cuerpos de agua en colaboración con autoridades sanitarias, ambientales y turísticas para enriquecer la selección de sitios de muestreo, procurando partir de un inventario lo más exhaustivo posible para priorizar el muestreo probabilístico por sobre el no probabilístico, que aporta sesgo a la investigación.
- b) Es deseable la ampliación del tamaño de muestra para mejorar las estimaciones y la potencia estadística, y replicar el trabajo en más regiones del país para darle mayor alcance a los resultados.
- c) Estandarizar los protocolos de aislamiento de AVL en búsqueda específica de *N. fowleri*, a partir de sedimentos y suelos asociados a los cuerpos de agua de interés, con el fin de aumentar las probabilidades de éxito en el hallazgo de la ameba.
- d) Incluir técnicas de cuantificación de AVL potencialmente patógenas en agua para determinar su concentración, ya que entonces se podría reflejar con más precisión el nivel de riesgo al que se exponen las personas en contacto con las fuentes de agua.

- e) Considerar la inclusión de nuevas variables ambientales de carácter antropogénico, ecológico, geomorfológico y atmosférico que se pueden asociar con la presencia de *N. fowleri* u otras AVL potencialmente patógenas, así como el análisis de la temporalidad del evento para probar la ocurrencia de patrones en el tiempo.

- f) Ampliar el número de personas encuestadas por el método CAP y considerar nuevas poblaciones objetivo como personal de salud o la población en general, para construir un perfil país de los saberes, creencias y acciones alrededor de la MAP y *N. fowleri*. De forma que pueda brindar más información sobre la problemática, requerimientos y obstáculos para la creación de nuevas y mejores intervenciones.

Sin duda, los hallazgos de esta propuesta de encuesta de vigilancia ambiental: i) confirman que las AVL de la familia Vahlkampfiidae, como microorganismos de amplia distribución, son aisladas fácilmente de reservorios naturales de agua dulce en Costa Rica y ii) representan un aporte pionero y relevante en el conocimiento sobre la presencia de *Naegleria* spp. y otras AVL termotolerantes en este tipo de lugar; siendo un punto de partida perfectible para sistematizar el monitoreo de AVL potencialmente patógenas en entornos de estrecho contacto con el ser humano; por lo que también se propone como recomendación de aplicación práctica que:

- a) Se promueva la política pública en torno a la normativa y actividades de manejo de riesgo ambiental, impulsando a su vez los estudios prospectivos sobre la detección de AVL potencialmente patógenas por medio de vigilancia ambiental especializada.

- b) Se refuerce la educación en salud alrededor del fenómeno con estrategias de comunicación y publicidad a través de medios tradicionales y redes sociales, en cooperación estratégica con la academia, proveedores de salud, autoridades en salud ambiental y recurso hídrico, y otras organizaciones relacionadas con la salud pública, con el fin de cerrar las brechas de comportamiento encontradas.

- c) A partir de nuevos estudios de mayor envergadura, se diseñen estrategias basadas en participación comunitaria y específicas en los contextos de riesgo en los que hay que trabajar desde los hábitos y creencias de las personas.

ANEXOS

Anexo 1. Instrucciones para autores de la Revista de Salud Ambiental.

Lista de comprobación para la preparación de envíos

Como parte del proceso de envío, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

- La petición no ha sido publicada previamente, ni se ha presentado a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al editor).
- El manuscrito se encuentra en un archivo de texto único en el cual **no se incluyen tablas, imágenes ni figuras**, sino sólo las referencias a las mismas. El fichero enviado está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF, o WordPerfect.
- Cada una de las tablas, imágenes y figuras se encuentra en un archivo independiente, con la misma numeración con la que aparece en el texto y con el pie explicativo correspondiente.
- Ninguno de los archivos que se subirán a la plataforma de la Revista durante el proceso de envío tiene un tamaño superior a 6 MB.
- El texto cumple con los requisitos bibliográficos y de estilo indicados en las [Normas para autores](#), que se pueden encontrar en Acerca de la revista.
- Los autores están de acuerdo con los términos recogidos en la [Nota de copyright](#), que se pueden encontrar en Acerca de la revista.

Directrices para autores/as

INDICACIONES GENERALES PARA LOS AUTORES

Los autores:

- sólo deberán presentar trabajos llevados a cabo de una manera ética y responsable, y que cumplan con todas las leyes pertinentes;
- deberán presentar sus resultados de forma clara, honesta y sin invención, falsificación o manipulación inapropiada de datos;
- deberían tratar de describir sus métodos de manera clara y sin ambigüedades para que sus conclusiones puedan ser confirmadas por otros;
- deben cumplir con los requisitos de que el trabajo presentado es original, no es un plagio, y no ha sido publicado en otra parte;
- deben asumir la responsabilidad colectiva de los trabajos presentados y publicados; deben asegurarse de que la autoría refleja con precisión las contribuciones individuales a la obra; y
- deben revelar las fuentes de financiación pertinentes y los conflictos existentes o potenciales de interés.

TIPOS DE ARTÍCULOS

Revista de Salud Ambiental consta de las siguientes secciones:

- **Originales**
Trabajos de Investigación, artículos de revisión y estudios de casos y análisis de actuaciones sobre salud y medio ambiente

extensión máxima del texto será de 12 páginas, admitiéndose un máximo de seis figuras y seis tablas. Es aconsejable que el número de autores no sobrepase los seis.

- **Colaboraciones especiales**

El texto tendrá una extensión máxima de 15 páginas. La bibliografía no será superior a las 60 referencias. Opcionalmente el trabajo podrá incluir tablas y figuras.

- **Otras secciones**

Tales como editoriales, cartas al director, revisiones, Información bibliográfica, etc.

ESTRUCTURA DE LOS TRABAJOS

Las siguientes normas de publicación son un resumen adaptado de las ["Recomendaciones para la preparación, presentación y publicación de trabajos académicos en revistas biomédicas"](#), elaboradas por el Comité Internacional de Directores de Revistas Biomédicas (ICMJE).

Cada manuscrito deberá someterse a un proceso de envío y se presentará en un documento de texto a doble espacio, utilizando letra tipo Arial 11, en tamaño de página DIN A4, dejando márgenes laterales, superior e inferior de 2,5 cm.

Su estructura se ajustará al siguiente orden: página del título, resumen, texto y bibliografía. Las tablas y figuras, con sus correspondientes títulos y pies explicativos, se presentarán en el mismo proceso de envío en archivos independientes, como ficheros complementarios.

Ni el documento de texto con el manuscrito, ni cada uno de los ficheros complementarios que acompañen al trabajo, podrán superar los 6 MB de tamaño.

Título, resumen y palabras clave

En la primera página se incluirá el título del trabajo y un resumen del mismo, con una extensión máxima de 250 palabras. Se describirá de forma concisa el motivo de la investigación, la manera de llevar a cabo la misma, los resultados más destacados y las principales conclusiones del trabajo.

Debajo del resumen se especificarán de 3 a 10 palabras clave que identifiquen el contenido del trabajo para su inclusión en los repertorios y bases de datos. Las palabras clave deberán ir separadas por punto y coma (;). Ej: salud; calidad del aire; cáncer.

Tanto el título, como el resumen y las palabras clave deben presentarse en español, portugués e inglés.

Texto

Las páginas siguientes serán las dedicadas al texto del artículo. Los artículos originales deben ir divididos en los siguientes apartados: Introducción, Material y métodos, Resultados y Discusión. Algún tipo de artículos, como revisiones, presentaciones de casos, etc. pueden precisar otro formato diferente.

- **Introducción**

Debe indicar con claridad y de forma resumida los fundamentos del trabajo y la finalidad del mismo, no incluyendo datos o conclusiones del trabajo que se publica.

- **Material y métodos**

Debe describir claramente la metodología utilizada, incluyendo la selección de personas o material estudiado, indicando los métodos, aparatos y/o procedimientos con suficiente detalle para permitir reproducir el estudio a otros investigadores. Se expondrán los métodos estadísticos y de laboratorio empleados.

Cuando se trate de trabajos experimentales en los que se hayan utilizado grupos humanos o animales, indicar las normas éticas seguidas por los autores. Los estudios experimentales en humanos deberán contar con la correspondiente aprobación. Cuando se haga referencia a productos químicos o medicamentos debe indicarse el nombre genérico.

- **Resultados**

Los resultados deben ser concisos y claros, incluyendo el mínimo necesario de tablas y figuras, de modo que no exista repetición de datos en el texto, ni en las figuras y tablas.

- **Discusión**

Se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, así como las conclusiones y aplicaciones. No deberán repetirse con detalle los resultados del apartado anterior y las conclusiones se apoyarán en los resultados del trabajo.

- **Agradecimientos**

Cuando se considere necesario se citará a las personas, centros o entidades que hayan colaborado en la realización del trabajo sin llegar a la calificación de autor.

Bibliografía

Las referencias bibliográficas se presentarán según el orden de aparición en el texto con la correspondiente numeración correlativa en números arábigos en superíndices. A continuación citamos algunos ejemplos:

Artículos de revistas

- Jerrett M, Gale S, Kontgis C. Spatial Modeling In Environmental and Public Health. *Research Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010; 7:1302-29.
- Cózar JM. Principio de precaución y medio ambiente. *Rev. Esp. Salud Pública* 2005; 79(2):133-44.

Libros y otras monografías

- Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Informe sobre desarrollo humano 2006. Más allá de la escasez: poder, pobreza y la crisis mundial del agua. Madrid: Mundí Prensa; 2006.
- Casas S, García A, Suárez S, et al. La salud en la evaluación de Impactos ambientales. Guía metodológica. Madrid: Sociedad Española de Sanidad Ambiental. 2011.

Capítulo de libro

- Ordóñez Iriarte JM. Radiaciones ultravioletas y cambio climático. Efectos en la salud. En: Martí Bosca JV, director, et al. Cambio global España 2020/50. Cambio climático y salud. Asturias: CCEIM-ISTAS-SESA. 2012. pp. 228-42.

Actas de conferencias y congresos

- Barcellos C, Coutinho K, Pina MF, et al. Health risk analysis of the Rio de Janeiro water supply using Geographical Information Systems. En: Abstracts of GIS In Public Health. San Diego, Estados Unidos: ESRI; 1998.
- Kimura J, Shibusaki H, editores. Recent advances In clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japón. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Documentos legales

- Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire. BOE nº 25, de 29 de enero.

Internet

- European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). European guidelines for control and prevention of travel associated legionnaires' disease. [actualizado en 2005; citado el 15 de mayo de 2012] Disponible en: <http://osha.europa.eu/data/links/the-european-guidelines-for-control-and-prevention-of-travel-associated-legionnaires-disease>.
- Esnaola S, Montoya I, Calvo M, et al. Atlas de mortalidad en áreas pequeñas de la CAPV (1996-2003). Vitoria-Gasteiz: Departamento de Sanidad y Consumo [actualizado en 2010; citado 29/05/2012] Disponible en: http://www.osasun.ejgv.euskadi.net/r52-20726/es/contenidos/informacion/publicaciones_informes_estudio/es_pub/adjuntos/atlas_mortalidad.pdf.

Tablas

Las tablas se presentarán en archivos independientes, un archivo por tabla (no superior a 6 MB), como ficheros complementarios. Se numerarán correlativamente con números arábigos, con el título en la parte superior y las pertinentes notas explicativas al pie.

Figuras e imágenes

Deberán ir numeradas consecutivamente, según el orden de aparición en el texto, en números arábigos. El pie contendrá la información necesaria para interpretar correctamente la figura sin recurrir al texto. Se presentarán en archivos independientes (no superiores a 6 MB), como ficheros complementarios, y con una resolución mínima de 300 ppp.

PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS Y PROCESO EDITORIAL

Los trabajos se enviarán a la **Revista de Salud Ambiental** mediante la plataforma disponible en la web <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa>. Para ello será imprescindible que el autor lleve a cabo el proceso de registro en dicha plataforma, relleno de los campos obligatorios de su perfil y marcando, al menos, la opción "Registrarse como autor", que podrá encontrar en la parte final del formulario. Una vez registrado, el autor podrá acceder a un proceso de envío en cinco pasos, durante los cuales le serán solicitados el archivo de texto con el manuscrito, los datos propios del artículo y los ficheros complementarios que vayan a incluirse en el texto.

La redacción de la **Revista de Salud Ambiental** acusará recibo a los autores de los trabajos que le lleguen y posteriormente informará de su aceptación o rechazo.

Los manuscritos serán revisados de forma anónima por evaluadores externos. La redacción de la **Revista de Salud Ambiental** se reserva el derecho de rechazar los artículos que no juzgue apropiados para su publicación, así como el de introducir modificaciones de estilo para adaptarse a las normas de publicación, comprometiéndose a respetar el contenido del original.

Previamente a la publicación del artículo, el autor recibirá copia de las pruebas para su corrección, que deberá devolver a la redacción de la revista dentro de las 72 horas siguientes a su recepción.

Revista de Salud Ambiental no devolverá los archivos originales, hayan sido aceptados o no para su publicación.

RESPONSABILIDADES ÉTICAS

Se incluirá el permiso de publicación por parte de la institución que haya financiado la investigación, si procede.

El envío del manuscrito implica que este no ha sido publicado anteriormente y que no está considerándose para su publicación en otra revista, libro, etc.

La responsabilidad de obtener los correspondientes permisos para reproducir parcialmente material de otras publicaciones corresponde a los autores.

Revista de Salud Ambiental declina cualquier responsabilidad sobre posibles conflictos derivados de la autoría de los trabajos que se publiquen.

Revista de Salud Ambiental no acepta la responsabilidad de las afirmaciones realizadas por los autores.