

NIVELES DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECÍFICOS CONTRA PROTEÍNAS DE
Cryptococcus neoformans Y *Cryptococcus gattii* EN SUEROS DE ADULTOS Y NIÑOS
COLOMBIANOS CON Y SIN DIAGNÓSTICO DE CRIPTOCOCOSIS

YENNY PAOLA BECERRA ALVAREZ

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA

BOGOTÁ, JUNIO DE 2022

NIVELES DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECÍFICOS CONTRA PROTEÍNAS DE
Cryptococcus neoformans Y *Cryptococcus gattii* EN SUEROS DE ADULTOS Y NIÑOS
COLOMBIANOS CON Y SIN DIAGNÓSTICO DE CRIPTOCOCOSIS

TOTAL AND SPECIFIC ANTIBODY LEVELS AGAINST PROTEINS OF *Cryptococcus*
neoformans AND *Cryptococcus gattii* IN SERA FROM COLOMBIAN ADULTS AND
CHILDREN WITH AND WITHOUT DIAGNOSTIC OF CRYPTOCOCCOSIS

Trabajo de investigación para optar al título de
MAGISTER EN EPIDEMIOLOGÍA

Presentado por
YENNY PAOLA BECERRA ALVAREZ

Tutores
CAROLINA FIRACATIVE, BSc, PhD
ÓSCAR QUIRÓS GÓMEZ, PhD

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA

BOGOTÁ, JUNIO DE 2022

La Universidad del Rosario y la Universidad CES no se hacen responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

DEDICATORIA

A mi familia, quienes han creído en mí y siempre me han acompañado. Especialmente a mi esposo Jorge, por su amor y comprensión fue posible culminar esta etapa. A mis hermanos y padres quienes siempre me han alentado a ser mejor.

AGRADECIMIENTOS

Se da la oportunidad para agradecer, al Grupo de Estudios en Microbiología Traslacional y Enfermedades Emergentes MICROS, de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, de la Universidad del Rosario por brindarme la oportunidad de participar en la ejecución de este proyecto, en especial, a mi tutora Carolina Firacative por su apoyo, dedicación y orientación durante este tiempo.

CONTENIDO

1. RESUMEN	11
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
2.1. Planteamiento del problema	13
2.2. Justificación	14
2.3. Pregunta de investigación	16
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1. Agentes etiológicos	17
3.2. Descripción de la patología	20
3.3. Criptococosis en Colombia	22
3.4. Respuesta inmune	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos específicos	26
6. METODOLOGÍA	27
6.1. Enfoque metodológico de la investigación	27
6.2. Tipo de estudio	27
6.3. Población	27
6.4. Diseño muestral	29
6.5. Diagrama de variables	30
6.6. Tabla de variables	30
6.7. Técnicas de recolección de información	31
6.8. Metodología experimental	32
6.9. Instrumento de recolección de información	34
6.10. Control de errores y sesgos	35
6.11. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos	36

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS	38
8. RESULTADOS	39
8.1. Características sociodemográficas	39
8.2. Niveles de anticuerpos totales	41
8.3. Asociación entre niveles de anticuerpos totales	43
8.4. Análisis bivariado de anticuerpos totales	43
8.5. Niveles de anticuerpos específicos	45
8.6. Análisis bivariado de anticuerpos específicos	46
8.7. Asociación entre anticuerpos totales y específicos	48
8.8. Asociación entre las variables sociodemográficas y clínicas de adultos y niños colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis, con los niveles de anticuerpos totales y específicos de dicha población de estudio.....	49
9. DISCUSIÓN	52
10. LIMITACIONES Y CONCLUSIONES	56
10.1. Limitaciones	56
10.2. Conclusiones	56
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
12. ANEXOS.....	67

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de variables.....	31
Tabla 2. Distribución de la población de estudio por edad, sexo y procedencia.....	40
Tabla 3. Distribución de la población de estudio con criptococosis y diagnóstico de VIH...	40
Tabla 4. Análisis descriptivo de anticuerpos totales en pacientes con criptococosis.....	41
Tabla 5. Análisis descriptivo de anticuerpos totales en personas sin criptococosis.....	41
Tabla 6. Comparación de anticuerpos totales entre la población con y sin criptococosis	42
Tabla 7. Pruebas de normalidad de anticuerpos totales en pacientes con criptococosis	42
Tabla 8. Pruebas de normalidad de anticuerpos totales en personas sin criptococosis	42
Tabla 9. Análisis bivariado de anticuerpos totales en pacientes con criptococosis	44
Tabla 10. Análisis bivariado de anticuerpos totales en personas sin criptococosis	44
Tabla 11. Comparación de anticuerpos específicos entre la población con y sin criptococosis	45
Tabla 12. Análisis de anticuerpos específicos Cn vs. Cg en la población con y sin criptococosis	46
Tabla 13. Correlación entre anticuerpos totales y específicos en la población de estudio....	48
Tabla 14. Asociación entre presentar o no criptococosis con anticuerpos totales	49
Tabla 15. Asociación entre presentar o no criptococosis con anticuerpos específicos	50
Tabla 16. Asociación entre ser del sexo masculino o femenino con anticuerpos específicos	50
Tabla 17. Asociación entre ser adulto o niño con anticuerpos específicos	51
Tabla 18. Asociación entre provenir de Bogotá o Norte de Santander con anticuerpos específicos	51

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la ruta de transmisión de la criptococosis	21
Figura 2. Distribución de casos de criptococosis en Colombia 1997-2016	22
Figura 3. Diagrama de variables	30
Figura 4. Distribución porcentual de los sueros de pacientes con y sin criptococosis en la población de estudio	39
Figura 5. Anticuerpos específicos en la población de estudio.....	47

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Manuscrito MIOC-2022-0145 sometido para publicación en la revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	67
Anexo 2. Formato de consentimiento informado utilizado en el estudio.....	104
Anexo 3. Cartas de aprobación del CTIN y el CEIN del Instituto Nacional de Salud.....	108
Anexo 4. Carta de aprobación del CEI, Universidad del Rosario	111

1. RESUMEN

Introducción: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* causan criptococosis, una micosis potencialmente mortal que mundialmente afecta principalmente a adultos inmunocomprometidos.

Objetivo: Contrastar anticuerpos totales y específicos contra antígenos proteicos de *C. neoformans* y *C. gattii* en sueros de pacientes con criptococosis e individuos sanos de Colombia. Metodología:

Estudio de casos y controles que incluyó sueros de niños y adultos con (n=109) y sin (n=119)

criptococosis de Colombia. Usando ELISA, se determinaron, en suero, los niveles totales de inmunoglobulina (Ig)G, IgA e IgM así como anticuerpos específicos contra proteínas

criptococócicas. **Resultados:** Generalmente, la producción de IgG total fue mayor en personas con criptococosis que en sanas mientras que IgA e IgM total fueron mayores en personas sanas que con

criptococosis. Los niveles específicos de IgG, IgA e IgM tendieron a ser mayores en personas con criptococosis que en sanas, y en adultos que en niños, con una correlación positiva entre reactividad

de los anticuerpos y edad. Todas las inmunoglobulinas fueron más reactivas contra proteínas de *C. neoformans* que de *C. gattii*. Se encontró una correlación positiva entre los niveles de

inmunoglobulinas totales y específicas. **Discusión:** En pacientes con criptococosis de Colombia, los niveles de inmunoglobulinas, totales y específicas, difieren con respecto a las personas sanas.

Se encontraron además variaciones en la producción de inmunoglobulinas específicas entre adultos y niños con criptococosis y entre la reactividad de estos anticuerpos con antígenos proteicos de *C.*

neoformans y *C. gattii*, lo que resalta el potencial papel de la producción de anticuerpos contra esta micosis.

Palabras clave: Criptococosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, inmunoglobulinas, Colombia.

ABSTRACT

Introduction: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* cause cryptococcosis, a life-threatening mycosis that mainly affects immunocompromised adults worldwide. **Objective:** To contrast total and specific antibodies against protein antigens of *C. neoformans* and *C. gattii* in sera from patients with cryptococcosis and healthy individuals from Colombia. **Methodology:** Case-control study that included sera from children and adults with (n=109) and without (n=119) cryptococcosis from Colombia. Using ELISA, the total levels of immunoglobulin (Ig)G, IgA and IgM, as well as specific antibodies against cryptococcal proteins were determined in serum samples. **Results:** Generally, the production of total IgG was higher in people with cryptococcosis than in healthy people, while total IgA and IgM were higher in healthy people than with cryptococcosis. Specific IgG, IgA and IgM levels tended to be higher in people with cryptococcosis than in healthy people, and in adults than in children, with a positive correlation between antibody reactivity and age. All immunoglobulins were more reactive against *C. neoformans* than against *C. gattii* proteins. A positive correlation was found between total and specific immunoglobulin levels. **Discussion:** In patients with cryptococcosis from Colombia, the levels of total and specific immunoglobulins differ with respect to healthy people. Variations were also found in the production of specific immunoglobulins between adults and children with cryptococcosis and between the reactivity of these antibodies with protein antigens from *C. neoformans* and *C. gattii*, which highlights the potential role of antibody production against this mycosis

Keywords: Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, immunoglobulins, Colombia

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

2.1. Planteamiento del problema

La criptococosis es una de las enfermedades fúngicas más graves que enfrentan los pacientes inmunocomprometidos, en particular aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en todo el mundo. La enfermedad es causada por especies de levaduras patógenas del género *Cryptococcus*, principalmente *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* (1). Globalmente, se estima que al año se presentan casi 223 100 casos de criptococosis meníngea, de los cuales, alrededor de 181 100 pacientes fallecen, lo cual indica una letalidad de 81,2% (2). Mientras que la criptococosis causada por *C. neoformans* se presenta principalmente en individuos inmunocomprometidos, en especial aquellos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las infecciones causadas por *C. gattii* son más frecuentes en pacientes inmunocompetentes o con factores de riesgo desconocidos o difíciles de determinar, en quienes se generan graves secuelas y se requiere aún más prolongados tratamientos (1, 3).

La infección tanto por *C. neoformans* como por *C. gattii* se produce por la inhalación de levaduras desecadas del medio ambiente, o posiblemente basidiosporas producidas sexualmente, las cuales se encuentran en excreta de palomas (*Columba livia*) y otras aves, en suelo contaminado con dichas excretas, así como en material vegetal y en descomposición de varias especies de árboles (4, 5). Aunque se estima que la primera exposición a *C. neoformans* ocurre a una temprana edad (~2 años) (6) y que la levadura puede permanecer latente por muchos años en los pulmones, de donde se puede diseminar posteriormente al sistema nervioso central (7), la prevalencia de la primera infección o exposición a *C. gattii* no ha sido establecida.

En Colombia, como en muchos otros países y al igual que otras micosis, la criptococosis no es de notificación obligatoria. Sin embargo, con la vigilancia voluntaria realizada en varios departamentos del territorio nacional, ha sido posible establecer que esta micosis causa altas tasas de morbimortalidad y que la infección actúa como un marcador centinela para la infección por

VIH. Es así, además, como se ha estimado que la tasa de incidencia en la población general del país es de 2.4 casos por cada millón de personas, mientras que, en los pacientes con VIH/SIDA, la incidencia aumenta a 1.1 casos por cada mil pacientes, siendo *C. neoformans* el principal agente etológico de la enfermedad (8).

Por otra parte, al no ser una enfermedad de reporte obligatorio, en Colombia no se han establecido diferencias regionales de exposición ambiental a los agentes etiológicos de la criptococosis, lo cual puede estar relacionado con las diferencias en la incidencia de la enfermedad que se han observado en algunos departamentos (8, 9). Al determinar los niveles de anticuerpos contra proteínas totales de *C. neoformans* y *C. gattii* en sueros de niños y adultos con diagnóstico de criptococosis de diversos departamentos colombianos, puede ser posible determinar si existen diferencias sero-epidemiológicas y regionales de esta micosis, no solo como infección oportunista, afectando inmunocomprometidos, sino también como infección primaria, afectando personas con un sistema inmune normal. Este estudio busca además hacer un acercamiento para establecer la presencia de anticuerpos contra proteínas totales de los agentes etiológicos de la criptococosis en individuos colombianos sin diagnóstico clínico de esta micosis, tan jóvenes como 1 año, lo cual permitirá hacer una aproximación a la edad en la cual ocurre la primera exposición ambiental a cada especie del hongo en el país, así como se ha reportado en otras regiones del mundo pero lo cual se desconoce en Colombia y en la región latinoamericana. Hasta ahora, no se han reportado los niveles de anticuerpos contra antígenos proteicos específicos de *C. neoformans* y *C. gattii* en una cantidad de sueros significativa, incluidos sueros de niños con y sin criptococosis. Por último, este estudio pretende, en general, contribuir al entendimiento de esta micosis humana y al estudio de sus agentes etiológicos.

2.2. Justificación

La criptococosis es una enfermedad micótica que amenaza la vida y afecta a los humanos y otros vertebrados. Cada año se reportan casos en todo el mundo, especialmente en pacientes con

VIH/SIDA. Aunque la mayor carga de esta micosis se identifica en el África subsahariana, con una mortalidad estimada entre el 50% y 70% de los casos (2), esta micosis es un importante problema en muchos países en vía de desarrollo en donde el VIH no está controlado en la población afectada. A pesar de que en Colombia esta micosis no es una enfermedad de notificación obligatoria, con estudios realizados por el Instituto Nacional de Salud a través de los datos de la encuesta epidemiológica de criptococosis en el país, ha sido posible establecer la incidencia de la criptococosis en diferentes periodos de tiempo. Entre los años 1997 a 2003 se estimó una incidencia de 0.23 casos por 100 000 personas, la cual aumentó a 0.25 casos por 100 000 personas entre 2004 y 2010, pero disminuyó a 0.17 casos por 100 000 personas en el período de 2011 a 2016 (8, 9). Considerando la limitada información disponible en Colombia, sobre las diferencias geográficas, epidemiológicas y la severidad de la enfermedad entre los agentes etiológicos de la criptococosis, se requieren hacer nuevas investigaciones que permitan establecer diferencias en cuanto a la respuesta inmune de los individuos, así como diferencias en la reactividad de proteínas criptocócicas que hacen de *C. neoformans* un patógeno oportunista y de *C. gattii* un patógeno primario, principalmente. Teniendo en cuenta la morbilidad y la alta tasa de mortalidad de la criptococosis, que en países de economía de ingresos medios, como Colombia, alcanza el 60% de los casos que no reciben tratamiento antifúngico apropiado (2, 8), es necesario hacer aportes al estudio de la epidemiología de la enfermedad, incluyendo la estimación de la prevalencia de infección asintomática en niños y en adultos, la cual se puede obtener por medio de estudios serológicos. Por último, dichos métodos serológicos para el estudio de la criptococosis son escasos en Colombia, por lo que este trabajo también pretende contribuir a la innovación tecnológica en el país y a la implementación de metodologías que se podrán utilizar no sólo para el estudio de la criptococosis, sino que se puedan aplicar al estudio de otras micosis. Los estudios serológicos proporcionan la base para la comprensión de la epidemiología y la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas, incluyendo la criptococosis.

2.3. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las diferencias en los niveles de anticuerpos IgG, IgA e IgM, totales y específicos contra proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii*, obtenidos de sueros de niños y adultos colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis?

3. MARCO TEÓRICO

La criptococosis es una micosis causada por levaduras patógenas del género *Cryptococcus*, mayoritariamente *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, las cuales se encuentran distribuidas ampliamente en el medio ambiente, principalmente en los excrementos de algunas aves y árboles de diversas especies (5, 10). Esta micosis se caracteriza por afectar inicialmente los pulmones y después diseminarse al sistema nervioso central (SNC) causando meningitis o meningoencefalitis, las cuales son las principales presentaciones clínicas (11). La criptococosis causada por *C. neoformans* es significativamente más frecuente a nivel mundial (>80% de los casos) que la causada por *C. gattii* (<20% de los casos), además, mientras que *C. neoformans* afecta principalmente a pacientes con VIH, los principales factores de riesgo para la infección por *C. gattii* son muchas veces desconocidos o difíciles de determinar (1, 12)

En términos epidemiológicos, *C. neoformans* y *C. gattii*, así como sus serotipos y genotipos, presentan diferencias en cuanto a la distribución geográfica y ambiental, los hospederos que afectan y la presentación clínica, y la virulencia y susceptibilidad a drogas antifúngicas, lo cual es relevante para el desenlace de la enfermedad y la terapia de elección.

3.1. Agentes etiológicos

El género *Cryptococcus* es un grupo polifilético de levaduras esféricas encapsuladas, clasificado en el reino Fungi, filo Basidiomycota, clase Tremellomycetes, orden Tremellales, familia Tremellaceae, que contiene más de 80 especies, dentro de las cuales, *C. neoformans* y *C. gattii* son las más recocidas por ser patógenas humanas, aun cuando otras especies como *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii* se han informado ocasionalmente como causas de infección (13). En 1894 en Italia, Sanfelice aisló por primera vez *C. neoformans* de un jugo de durazno y lo nombró *Saccharomyces neoformans* (14). En el mismo año, Busse y Buschke proporcionaron la primera descripción de un caso de criptococosis y aislaron una levadura de una lesión similar a un sarcoma en la tibia de una joven infectada que posteriormente falleció por infección diseminada. Busse y

Buschke llamaron al hongo *Saccharomyces hominis*, mientras nombraban la enfermedad sacromicosis hominis (15). Casi al mismo tiempo, Curtis estudió un hongo similar el cual fue aislado de un tumor de la cadera de un paciente, pero al notar su diferencia con los cultivos de Busse y Sanfelice, le dio el nombre de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. Debido a que las levaduras de Sanfelice y Busse carecían de la formación de ascosporas y de la fermentación de azúcares que son características del género *Saccharomyces*, Vuillemin, en 1901, reclasificó estas dos levaduras como *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus hominis*, respectivamente (16).

El neurotropismo característico de *C. neoformans* fue reconocido por primera vez en 1914 por Versé, y dos años después por Stoddard y Cutler (17). Sin embargo, Stoddard y Cutler llamaron al agente etiológico *Torula histolytica* y la enfermedad "torulosis" al malinterpretar que la cápsula fúngica era evidencia de la acción histolítica fúngica en el tejido del huésped. La confusión sobre la identidad del agente etiológico de la criptococosis persistió hasta que Benham, en 1935, realizó estudios exhaustivos con 22 cepas clínicas de *Cryptococcus*, incluyendo las levaduras de Sanfelice y Busse que lo llevaron a concluir que todas las cepas de infecciones humanas pertenecían a una especie con dos variedades basadas en diferencias serológicas. Desde entonces, se propuso reemplazar "torulosis/meningitis por torula" por "criptococosis" y conservar el nombre del hongo como *Cryptococcus neoformans* (18).

La heterogeneidad antigénica criptococócica fue confirmada en 1950 por Evans, quien identificó tres serotipos, A, B y C, y por Vogel en 1966, quien describió un cuarto serotipo D (17). Subsecuentemente, se separaron dos variedades de *C. neoformans*, teniendo en cuenta los serotipos: *C. neoformans* var. *neoformans* para los serotipos A y D y *C. neoformans* var. *gattii* para los serotipos B y C. Entre 1975 y 1982, Kwon-Chung identificó una nueva morfología que denominó del género *Filobasidiella* y la especie *Filobasidiella neoformans*, la cual definía el estado teleomorfo o sexual de *C. neoformans* var. *neoformans*, así como *Filobasidiella bacillispora*, la cual definía el estado teleomorfo de *C. neoformans* var. *gattii*. Con estas observaciones se reconoció que la morfogénesis del estado asexual al sexual de estas levaduras se debe a su capacidad de apareamiento entre tipos de pareja sexual opuestos a y alfa (19, 20). En 1999,

C. neoformans var. *grubii* fue propuesta como una nueva variedad para el serotipo A, y *C. neoformans* var. *neoformans* para el serotipo D, con base en importantes diferencias genóticas entre estos serotipos (21). En 2003, Kwon-Chung y colaboradores, observaron que las variedades de las levaduras presentaban estructuras sexuales diferentes, por lo que merecían el nivel de especies separadas, *C. neoformans* y *C. gattii*, con cuatro serotipos identificados por reacciones de aglutinación capsular, A, B, C, D y un híbrido AD. Durante varias décadas, estas dos especies que también son especies altamente complejas entre sí se reconocieron como el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* (17, 22). Actualmente y desde el año 2015, con base en estudios de genotipificación molecular, se propuso separar las dos variedades de *C. neoformans*, var. *grubii* y var. *neoformans*, en dos especies diferentes, y nombrar cinco especies separadas dentro de *C. gattii* (23), lo cual hasta el momento sigue presentando controversia.

En términos ecológicos, las dos especies son saprofitas, ampliamente distribuidas en el medio ambiente, y que presentan diferencias tanto en el hábitat como en la distribución geográfica. Mientras que *C. neoformans* tiene distribución mundial y predilección por suelos contaminados con excrementos de aves, especialmente de palomas (*C. livia*), *C. gattii* se consideraba anteriormente como una especie limitada a regiones tropicales y subtropicales, asociada con diversas especies de árboles, particularmente eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*) (5). Sin embargo, desde el brote de infección reportado en Vancouver, Canadá en 1999, se ha observado una clara capacidad de adaptación de *C. gattii* a una variedad de latitudes, aislándose en áreas templadas de diferentes partes del mundo y en una gran variedad de especies de árboles como abetos (*Pseudotsuga menziesii*, *Tsuga heterophylla*), eucaliptos rojos (*Corymbia ficifolia*), higos (*Ficus bogotanensis*), entre otros, y también en material vegetal en descomposición (24, 25).

Aunque muchos animales domésticos y silvestres pueden desarrollar criptococosis sistémica y del SNC, hasta el momento, no se ha encontrado evidencia de transmisión zoonótica de la enfermedad. Sin embargo, por métodos de tipificación molecular de los aislamientos recuperados de los

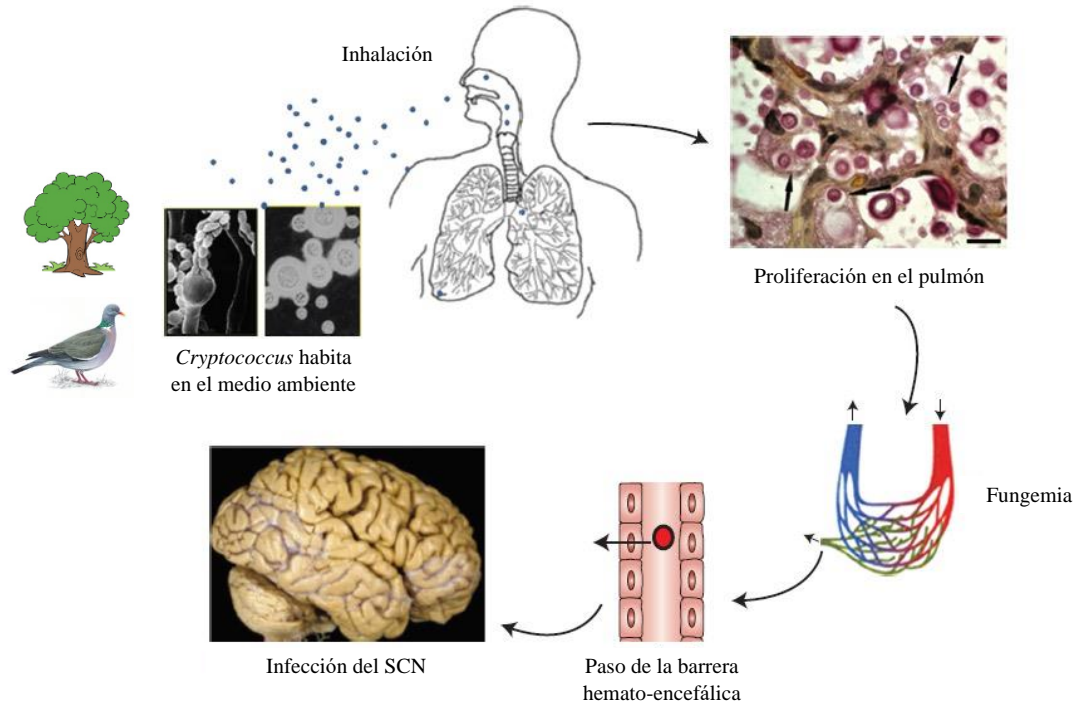
pacientes y del medio ambiente en torno de estos pacientes, ha sido posible dar evidencia de la adquisición de la infección de fuentes ambientales, ya que se ha encontrado que los mismos genotipos están presentes tanto en la población clínica como en la ambiental (26).

3.2. Descripción de la patología

La criptococosis es una enfermedad infecciosa potencialmente mortal, que inicia por la inhalación de células de levaduras desecadas y/o basidiosporas del medio ambiente (4, 11). Una vez en los pulmones, donde pueden formar lesiones en masa o granulomas, las células de levadura se diseminan al SNC, específicamente al cerebro y las meninges, causando meningitis aguda, subaguda o crónica, así como meningoencefalitis grave, que podría ser una condición fatal si no se trata (1, 27) (Figura 1). La criptococosis pulmonar presenta manifestaciones clínicas variables, desde una infección asintomática, como un nódulo solitario, hasta una neumonía grave, con síntomas de fiebre, tos productiva, dolor torácico y pérdida de peso (28). De manera similar a otros hongos de importancia médica, los agentes etiológicos de la criptococosis podrían esencialmente infectar todos los órganos del huésped, causando infecciones que van desde lesiones cutáneas hasta órganos profundos (29, 30)

Aunque esta micosis se identificó hace más un siglo, el número de casos aumentó drásticamente con la aparición de la epidemia del SIDA en la década de 1980 (27), siendo actualmente la micosis oportunista líder causando meningitis en pacientes con VIH (31-33). Sin embargo, además de las infecciones por el VIH, existen otros factores predisponentes para la criptococosis y el número de casos de esta micosis aumenta constantemente con el uso cada vez mayor de terapias de inmunosupresión en pacientes con trasplantes y cáncer (34-36). La infección parece afectar predominantemente a hombres adultos jóvenes, aunque no se conoce ninguna evidencia significativa para una distinción de susceptibilidad entre sexo, edad y razas. En los niños, la criptococosis tiene una incidencia significativamente menor que en adultos, incluso entre los pacientes con SIDA (37-39).

Figura 1. Representación de la ruta de transmisión de la criptococosis



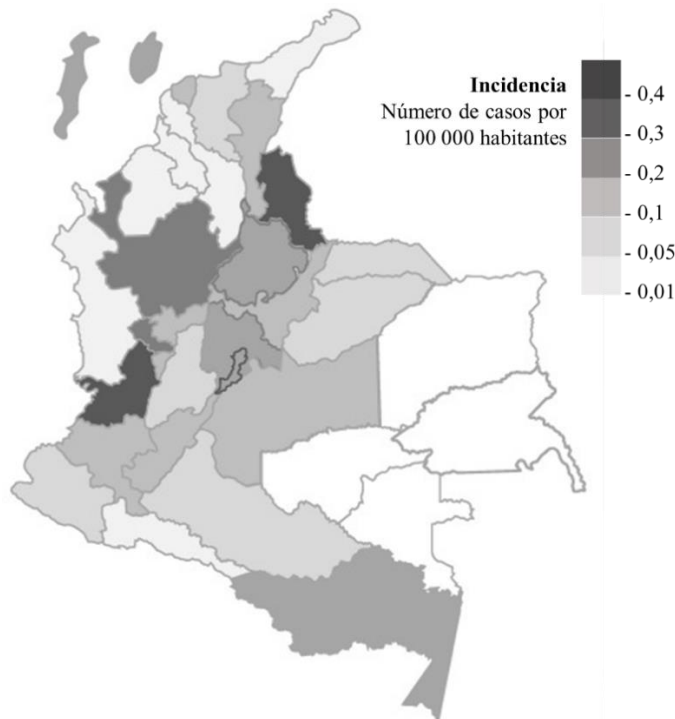
Fuente: adaptado de Kwon-Chung, *et al.* (1). Copyright © 2014 Cold Spring Harbor Laboratory Press; todos los derechos reservados.

Como infección oportunista que afecta a huéspedes inmunodeprimidos, la criptococosis es causada principalmente por *C. neoformans*, mientras que en individuos inmunocompetentes o con factores de riesgo indeterminados, *C. gattii* ha sido reportado usualmente como responsable de la mayoría de los casos de infección criptocócica, afectando no solamente a humanos sino animales domésticos y silvestres (26, 40). Las manifestaciones clínicas también pueden diferir entre estas dos especies. Mientras que *C. neoformans* causa pequeñas lesiones pulmonares (observadas en los rayos X) asociadas con la meningitis, *C. gattii* causa grandes masas inflamatorias (criptocomas) y comúnmente produce secuelas neurológicas que requieren cirugía y terapia antifúngica a largo plazo (41, 42). De esta manera, aunque la infección por *C. neoformans* se presenta principalmente como meningoencefalitis, la infección pulmonar es considerablemente más común con la infección por *C. gattii* (1).

3.3. Criptococosis en Colombia

En Colombia, *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, predomina en los casos clínicos de criptococosis, así como en las muestras ambientales. Sin embargo, *C. gattii*, serotipos B y C, también se ha reportado causando infección y habitando diversos árboles como nicho ambiental, especialmente los eucaliptos para el serotipo B, y los almendros (*Terminalia catappa*) como potenciales hospederos para el serotipo C (43, 44). Hasta el momento, en el país sólo se han reportado seis casos de infección por el serotipo D, pero ninguno de muestras ambientales (45).

Figura 2. Distribución de casos de criptococosis en Colombia 1997-2016



Fuente: adaptado de Escandón, *et al.* (8). *J. of Fungi*, Creative Commons Attribution License.

Con respecto a la incidencia de la infección, se estima que en la población general de Colombia se presentan, anualmente, 2,4 casos de criptococosis por millón de habitantes, siendo mayor en pacientes VIH positivos, en quienes la incidencia es de 1,1 casos por cada mil pacientes (8, 46).

No obstante, de los casos de criptococosis causados por *C. gattii* en el país, que oscilan alrededor de un 4%, más del 90% de los casos provienen de pacientes sin factores de riesgo definidos (47). Además, cabe resaltar que Norte de Santander es el departamento con la mayor incidencia de criptococosis en la población general del país (0.56 casos por cada 100 000 habitantes) (Figura 2) (8). La criptococosis en Colombia, al igual que en el resto del mundo, es más común en hombres adultos jóvenes, principalmente entre 26 a 40 años, con una mortalidad cercana al 50% de los pacientes (8). Sin embargo, en el país se ha reportado una incidencia anual promedio de 0.017 casos por mil menores de 16 años (39).

3.4. Respuesta inmune

La criptococosis comienza con la inhalación, hacia los pulmones, de células de levadura desecadas en el aire, o posiblemente basidiosporas producidas sexualmente. Debido a que los propágulos son pequeños (1.5 - 3.5 μm), éstos alcanzan las vías aéreas distales y entran en contacto con los macrófagos alveolares. Dichos macrófagos alveolares activados reclutan otras células inmunes a través de citocinas y quimiocinas y provocan una respuesta Th1 adecuada y una inflamación granulomatosa (32, 48, 49). Por otro lado, investigaciones en ratones han reportado la acción del sistema del complemento donde éste juega un papel primordial frente a *Cryptococcus*, ya que ratones con deficiencias en C3 no pueden activar la vía del complemento alternativa, son más sensibles a la criptococosis (7, 50).

En un huésped normal, una respuesta inmune efectiva elimina la mayoría de las células de *Cryptococcus* inhaladas. En contraste, en un huésped inmunocomprometido, las células criptococócicas proliferan, se diseminan de manera hematógena hacia el cerebro y al cruzar la barrera hematoencefálica se adaptan a los niveles subóptimos de oxígeno y condiciones nutricionales del cerebro para multiplicarse y causar meningoencefalitis (51, 52). La infección del SNC es por lo tanto la presentación clínica más común de la criptococosis y la causa más común de muerte. Otra infección criptococócica frecuente es la formación de un pequeño complejo

pulmón-linfático donde las levaduras permanecen viables pero latentes y estos pacientes permanecen clínicamente asintomáticos hasta la pérdida de la inmunidad local como resultado de diversas causas, como el tratamiento con corticosteroides, la progresión de una infección por VIH u otras afecciones inmunosupresoras (34, 35). Ante esta pérdida de inmunidad, las células de levadura latentes se activan y comienzan a multiplicarse en el complejo pulmonar-ganglio linfático y se diseminan a sitios extrapulmonares (7, 50).

Con respecto a la inmunidad humoral, se sabe que la infección criptocócica provoca una fuerte y rápida respuesta con la generación de anticuerpos (6, 53), aunque el papel de estos anticuerpos no se ha entendido del todo y no existen estudios clínicos ni serológicos que asocien la presencia y clase de anticuerpos con la persistencia de la infección, recaída, reactivación y reinfección. Sin embargo, varios estudios serológicos han determinado la reactividad y la prevalencia de anticuerpos contra el polisacárido glucuronoxilomanano (GXM), el componente principal de la cápsula criptocócica y el más antigénico, en diferentes pacientes y grupos de control (54, 55). Por el contrario, no hay tantos estudios que hayan explorado los anticuerpos producidos contra antígenos proteicos no capsulares específicos de las dos especies criptocócicas principales.

Se han descrito proteínas inmunorreactivas de *C. neoformans* y *C. gattii* que inducen respuestas inmunitarias protectoras en ratones (12, 56, 57). Además, mediante inmunoproteómica, se han identificado antígenos proteicos asociados a la criptococosis que desempeñan un papel en la patogenia de la infección en roedores y koalas (53, 58, 59). En humanos, antígenos proteicos de *C. neoformans* y *C. gattii* que reaccionan con la inmunoglobulina (Ig)G también se han reconocido en diversas poblaciones, incluidos adultos con criptococosis, con y sin infección por VIH, así como en niños y adultos sanos (6, 53, 60, 61). Además de IgG, se han identificado proteínas específicas de *C. neoformans* que reaccionan con IgM e IgA en pacientes con criptococosis y personas sanas (62-64). Más recientemente, mediante un enfoque inmunoproteómico y posterior expresión recombinante, se identificaron proteínas de *C. neoformans* asociadas a la enfermedad y las cuales son reactivas con anticuerpos IgG de sueros de pacientes adultos con y sin criptococosis de Colombia (65).

4. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H₀): Los niveles de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) totales y específicos contra proteínas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, son iguales entre los sueros de adultos y niños colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis.

Hipótesis Alternativa H_a: Los niveles de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) totales y específicos contra proteínas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, presentan diferencias entre los sueros de adultos y niños colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Contrastar los niveles de anticuerpos IgG, IgA e IgM, totales y específicos contra proteínas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, en sueros de adultos y niños colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis.

5.2. Objetivos específicos

- Describir las características sociodemográficas, clínicas y serológicas de la población de estudio.
- Determinar los niveles de anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) en adultos y niños de Colombia con y sin diagnóstico de criptococosis.
- Determinar los niveles de anticuerpos específicos (IgG, IgA e IgM) contra proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii* en adultos y niños de Colombia con y sin diagnóstico de criptococosis.
- Hacer un acercamiento al establecimiento de la edad mínima en la cual se identifican anticuerpos contra proteínas criptocócicas, lo cual se relaciona con la edad en la que ocurre la primera exposición ambiental a *C. neoformans* y *C. gattii* en individuos sanos.
- Determinar la asociación que pueda existir entre las variables sociodemográficas y clínicas de adultos y niños colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis, con los niveles de anticuerpos totales y específicos de dicha población de estudio.

6. METODOLOGÍA

6.1. Enfoque metodológico de la investigación

Se llevó a cabo un enfoque metodológico de tipo cuantitativo con un componente observacional analítico de casos y controles aplicado al estudio de una enfermedad infecciosa causada por hongos.

6.2. Tipo de estudio

Estudio analítico de casos y controles, donde los casos correspondieron a pacientes con diagnóstico de criptococosis y los controles a personas sanas, como se define en la descripción detallada en 6.3

6.3. Población

La población de estudio estuvo integrada por dos grupos:

1. Pacientes con diagnóstico de criptococosis
2. Personas sin diagnóstico de criptococosis (personas sanas)

De estos dos grupos poblacionales se obtuvieron sueros sanguíneos, de los cuales, se determinaron, experimentalmente, los niveles de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) tanto totales como específicos contra proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii*.

Pacientes con criptococosis: definidos como aquellos niños y adultos que presentaron hallazgos clínicamente consistentes con esta micosis, ya sea por hemocultivo positivo (cultivo de sangre) para el aislamiento de *C. neoformans* o *C. gattii* y/o por detección de antígeno criptococócico en suero, con base en el sistema de aglutinación de látex CALAS® (Meridian Bioscience) (66). De estos pacientes con criptococosis se obtuvieron sueros, los cuales hacen parte de la seroteca del

Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, y los cuales fueron obtenidos de sangre tomada previamente para otros fines (ver sección 7. Consideraciones Éticas), por lo tal, no hubo recolección de datos de estos pacientes. No obstante, en su mayoría, estos pacientes contaban con datos de edad, sexo y procedencia geográfica (departamento colombiano), información sobre su estado inmunológico, específicamente si el paciente tenía diagnóstico de VIH en el momento de hacer el diagnóstico de la criptococosis, dado que éste es el principal factor de riesgo para desarrollar esta micosis, si existe algún otro factor de riesgo asociado a la enfermedad y la especie del agente etiológico causando la criptococosis, la cual se identificó mediante métodos fenotípicos, incluyendo la actividad de ureasa y la asimilación de glicina en el medio azul de L-canavanina-glicina-bromotimol (66).

Personas sin criptococosis: definidos como aquellos niños y adultos que no hubieran presentado síntomas ni hallazgos clínicos consistentes con criptococosis, u otra enfermedad infecciosa al momento de su participación en el estudio, y que su estado inmunológico no se encontrara comprometido, es decir, que la persona no tuviera diagnóstico de VIH en el momento de hacer el diagnóstico de la criptococosis. De estos pacientes sin criptococosis se obtuvieron sueros de sangre recolectada luego de haber firmado un consentimiento informado (ver sección 7. Consideraciones Éticas) en donde se manifiesta su aprobación para participar en el estudio y donde se suministra información de edad, sexo y procedencia geográfica de la persona, información sobre su estado inmunológico y si existe algún factor de riesgo asociado. Todas las muestras de sangre de personas sanas fueron tomadas por venopunción en tubo sin anticoagulante. Estos sueros están actualmente en preservación y bajo custodia en el laboratorio del Grupo MICROS de la Universidad del Rosario, sede Quinta de Mutis.

Para los efectos de este estudio, se definió como adulto a toda persona cuya edad era mayor de 21 años y como niño a toda persona entre 0 y 21 años, siguiendo las definiciones de las guías sobre el diagnóstico, prevención y manejo de la criptococosis en pacientes infectadas con VIH (67).

Criterios de inclusión:

1. Sueros de pacientes con diagnóstico de criptococosis que contaran con datos de procedencia geográfica y al menos un dato sociodemográfico (edad, sexo) y un dato clínico (estado VIH, agente etiológico) adicionales.
2. Sueros de pacientes sin diagnóstico de criptococosis y que no presentaran ninguna enfermedad infecciosa aparente o diagnosticada en el momento de la toma de la muestra.

Criterios de exclusión:

1. Sueros de pacientes con diagnóstico de criptococosis que no contaran con datos de procedencia geográfica ni con al menos un dato sociodemográfico (edad, sexo) y un dato clínico (estado VIH, agente etiológico).
2. Sueros de pacientes sin diagnóstico de criptococosis que presentaran alguna enfermedad infecciosa en el momento de la toma de la muestra.

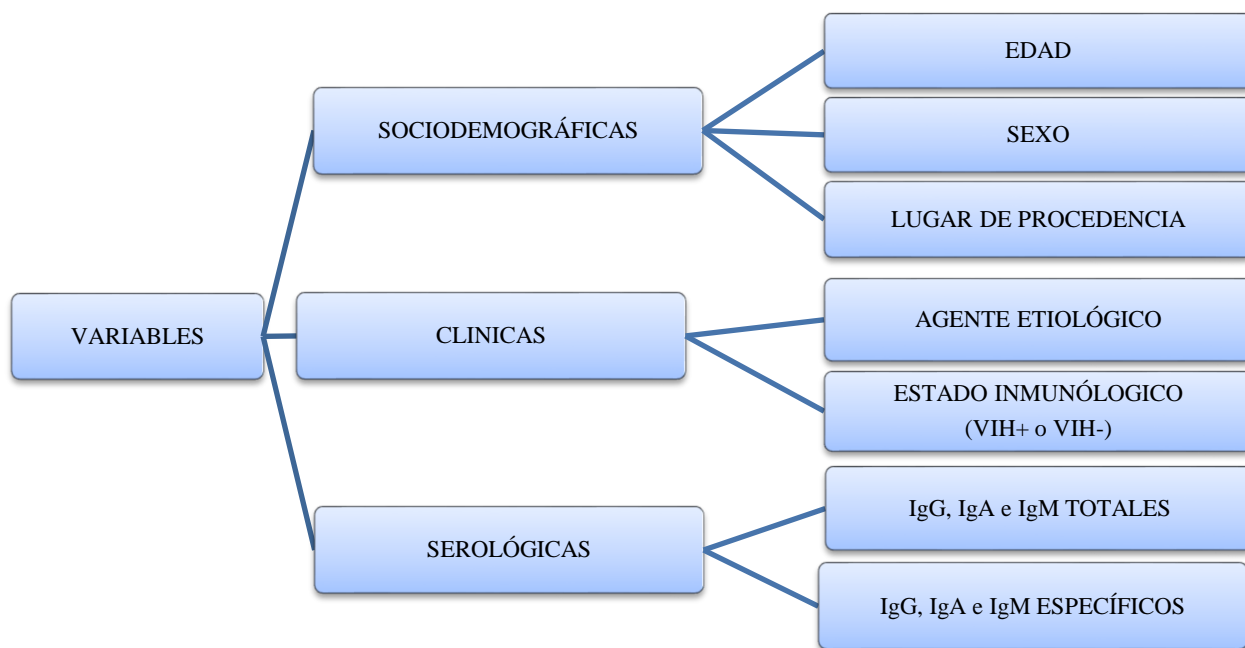
6.4. Diseño muestral

Se realizó un diseño muestral no probabilístico por conveniencia. Debido principalmente al tipo de experimentación requerida, la cual tiene un alto costo, el tamaño de muestra de cada grupo estudiado (con y sin criptococosis), no podía exceder significativamente los 100 pacientes de donde se obtuvieron los sueros. Por otro lado, si se considera el número total de casos de criptococosis reportados en Colombia desde 1997 hasta 2016 ($n=1974$) (8), se podría calcular, con un nivel de confianza de 95% y un margen de error de 5%, un tamaño de muestra ideal igual a 322 que representaría la población con criptococosis en el país. Sin embargo, debido a que esta micosis no es de notificación obligatoria en Colombia, la mayoría de las veces no se envían muestras de suero al Instituto Nacional de Salud, y muchas de ellas carecen de datos demográficos, por lo tal, no fue posible incluir 322 muestras en este estudio. No obstante, si se considera la incidencia anual de la criptococosis en Colombia, la cual es de 2,4 casos por millón de habitantes (8), es decir, 109,2 casos en promedio por año, es posible calcular, un tamaño de muestra ideal igual a 86 (Estos

cálculos se hicieron a través de la página en internet <https://www.calculator.net>). De esta manera, 100 muestras, además de arrojar resultados significativos, representa el número de casos anuales de criptococosis en adultos en Colombia (8). Debido al escaso número de casos de criptococosis en niños, se incluyeron todas las muestras existentes para este grupo de edad.

6.5. Diagrama de variables

Figura 3. Diagrama de variables



Fuente: elaboración propia de los autores

6.6. Tabla de variables

Para este estudio se tuvieron en cuenta las siguientes variables de acuerdo con los objetivos planteados. Los valores de anticuerpos obtenidos (variables serológicas) se analizaron con respecto a los datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes.

Tabla 1. Tabla de variables

Variable	Definición	Naturaleza	Nivel	Resultado
Edad	Número de años cumplidos que una persona ha vivido desde su nacimiento	Cuantitativa discreto	Razón	Años
Sexo	Condición biológica que determina el género	Cualitativa	Nominal	Femenino Masculino
Procedencia	Lugar de residencia	Cualitativa	Nominal	Departamentos de Colombia
Agente etiológico	Especie causante de criptococosis	Cualitativa	Nominal	<i>C. neoformans</i> <i>C. gattii</i>
Estado inmunológico	Existencia de algún tipo de inmunosupresión por VIH	Cualitativa	Nominal	VIH+ VIH-
IgG total	Concentración de IgG en suero	Cuantitativa	De razón	µg/ml
IgA total	Concentración de IgA en suero	Cuantitativa	De razón	µg/ml
IgM total	Concentración de IgM en suero	Cuantitativa	De razón	µg/ml
IgG específica	Densidad óptica (OD) de reactividad de IgG con proteínas criptocócicas	Cualitativa	Intervalo	OD
IgA específica	Densidad óptica (OD) de reactividad de IgA con proteínas criptocócicas	Cualitativa	Intervalo	OD
IgM específica	Densidad óptica (OD) de reactividad de IgM con proteínas criptocócicas	Cualitativa	Intervalo	OD

Fuente: elaboración propia de los autores

6.7. Técnicas de recolección de información

Toda la información para realizar el presente estudio fue recolectada de fuentes de información secundarias a partir de dos registros. Primera, la base de datos suministrada por el Instituto Nacional de Salud que contiene los datos de los pacientes de donde se obtuvieron las muestras de suero provenientes de la seroteca del Grupo de Microbiología y quienes presentaron hallazgos clínicamente consistentes con criptococosis, en el periodo de tiempo comprendido entre 1995 hasta 2019. Segunda, la información demográfica obtenida, posterior a la firma del consentimiento

informado, de los individuos que no hubieran presentado síntomas ni hallazgos clínicos consistentes con criptococosis ni otra enfermedad infecciosa y aceptaron participar en el estudio.

6.8. Metodología experimental

Extracción de proteínas totales de *C. neoformans* y *C. gattii*: Para la extracción de proteínas se utilizaron las cepas de referencia de *C. neoformans*, H99, y de *C. gattii*, H0058-I-2029, las cuales representan los genotipos/serotipos más comunes de estas especies causando criptococosis en Colombia, VNI/A y VGII/B, respectivamente (8). Las proteínas criptococócicas totales se extrajeron de ambas cepas, por separado, como se ha reportado anteriormente (59, 65), con algunas modificaciones. Brevemente, cada cepa se recuperó de su almacenamiento a -80 °C en glicerol al 10%, por medio de su cultivo en agar dextrosa Sabouraud durante 48 horas a 27 °C. De cada cultivo, se transfirió una sola colonia a un frasco con caldo dextrosa Sabouraud, el cual se incubó con agitación a 80 rpm y 30 °C durante 48 h. Posteriormente, las células se concentraron por centrifugación y se lavaron dos veces con sacarosa 250 mM. Luego, alrededor de 5 g de células centrifugadas, se suspendieron en 5 ml de tampón de lisis 2X (Tris/HCl 10 mM pH 7,5 suplementado con EDTA 5 mM e inhibidor de proteasa 1X (Roche)) y 5 ml de una solución que contenía 8% de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) y ditioneitol 100 mM (DTT). Esta suspensión se sirvió en un mortero, las células se congelaron con nitrógeno líquido y se homogeneizaron dos veces consecutivas, mediante maceración manual con mortero. Para concentrar las muestras de proteínas y eliminar los contaminantes, incluidas las sales, los detergentes y los carbohidratos, las proteínas se recuperaron mediante centrifugación, después de la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y la concentración se midió con el equipo NanoDrop™One/One (ThermoFisher Scientific) utilizando el método de Bradford (ThermoFisher Scientific). Las muestras de proteínas se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su posterior uso.

Determinación de inmunoglobulinas totales: Los niveles totales de IgG, IgA e IgM de todas las muestras de sueros se cuantificaron mediante ELISA (por sus siglas del inglés *Enzyme-Linked*

Immunosorbent Assay), como se ha descrito anteriormente (59, 65). Brevemente, por separado, se recubrieron placas de fondo redondo de 96 pocos con 50 μ l de IgG-, IgA- o IgM- antihumana de cabra (SouthernBiotech), respectivamente, las cuales estaban en una dilución 1:1000 en tampón de carbonato. Estas placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las placas se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Tween-20 al 0,05 % (PBST), se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS 1X, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % y gelatina al 0,1 %) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBST. Como estándares para determinar la concentración de cada inmunoglobulina, se utilizaron IgG (0,5 μ g/ml), IgA (2 μ g/ml) e IgM (2 μ g/ml) humanas (SouthernBiotech), respectivamente. Los sueros de la población del estudio se suspendieron en tampón de bloqueo que contenía Tween-20 al 0,05%, a una dilución de 1:100.000 para IgG y 1:2.000 para IgA e IgM. Cada suero diluido se sirvió por triplicado en las placas, las cuales se incubaron posteriormente, junto con las inmunoglobulinas estándar, durante 1,5 h a temperatura ambiente, para luego ser lavadas tres veces con PBST. La detección de la reacción se realizó con IgG-, IgA- e IgM-antihumana de cabra marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (SouthernBiotech) y diluidas 1:4.000. Después de 2 h de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con PBST y se revelaron con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich). Inmediatamente después de que los pocillos con la concentración más alta de cada anticuerpo estándar alcanzaran una densidad óptica de 1,3 a 650 nm, se detuvo el revelado de las placas añadiendo H₂SO₄ 0,5 M (Sigma-Aldrich). La lectura final de las placas se hizo a 450 nm y, teniendo en cuenta la concentración de los anticuerpos estándar, se calculó la concentración de cada isotipo de inmunoglobulina por cada muestra de suero, utilizando el programa del fotómetro de microplacas *accuSkan FC* (ThermoFisher Scientific).

Determinación de inmunoglobulinas específicas: Las IgG, IgA e IgM específicas contra las proteínas totales de *C. neoformans* y *C. gattii* se determinaron, por separado, para todas las muestras de suero como se describió anteriormente (59), con varias modificaciones. Por cada pozo, las placas de ELISA se recubrieron con 0,5 μ g de proteínas totales de *C. neoformans* o *C. gattii*, respectivamente, y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las placas se lavaron

una vez con PBST y el bloqueo se realizó con leche descremada al 5% disuelta en PBS (SM). Los sueros se suspendieron en SM que contenía Tween-20 (SMT) al 0,05 %, a una dilución de 1:100 para IgG y 1:25 para IgA e IgM. Cada suero diluido se sirvió por duplicado en las placas, y no por triplicado, debido al volumen restringido de sueros. La detección se realizó IgG-, IgA- e IgM-antihumana de cabra-HRP, respectivamente (SouthernBiotech), diluidas 1:4.000. El desarrollo de las placas se realizó con TMB durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se detuvo con H₂SO₄ 0,5 M antes de la determinación de la densidad óptica (DO) a 450 nm. El límite de detección para determinar IgG, IgA e IgM específicas frente a proteínas criptocócicas fue una DO < 4,0 y >0,1 teniendo en cuenta que siempre se restaron los valores de los pozos en blanco. Para todos los experimentos de ELISA, dichos pozos que se usaron como blancos, correspondían a pozos incubados sin muestras de suero pero con todos los demás reactivos. No se realizó la titulación de los sueros debido al pequeño volumen de la mayoría de las muestras.

6.9. Instrumento de recolección de información

Se tomó la información de la base de datos del Instituto Nacional de Salud, se obtuvieron los datos sociodemográficos tales como sexo, edad, lugar de procedencia (departamento), agente etiológico causando la criptococosis, estado inmunológico y factores de riesgo (Tabla 1). Toda la información personal fue anonimizada. Posterior a la firma del consentimiento informado, se obtuvieron los datos sociodemográficos tales como sexo, edad, lugar de procedencia (departamento), estado inmunológico y factores de riesgo de los participantes sin hallazgos clínicos de criptococosis (población sana). Toda esta información fue almacenada en una base de datos.

Los datos del nivel de anticuerpos totales y específicos contra proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii* se obtuvieron del programa del equipo de microplacas fotómetro *accuSkan FC* de la marca ThermoFisher Scientific.

6.10. Control de errores y sesgos

Sesgo de selección: con un nivel de probabilidad muy bajo o nulo, debido a las características de la criptococosis, los factores de riesgo y las manifestaciones clínicas tan evidentes, este estudio podría presentar sesgos de selección de participantes sanos, cuando éstos no hubieran manifestado síntomas compatibles con criptococosis en el momento de diligenciar el consentimiento informado y por lo tal, las muestras de suero recuperadas de estos pacientes se incluyeran dentro del grupo de personas sanas. Por otro lado, el reducido número de participantes y por lo tal, muestras de varios departamentos, así como de niños, no permitió establecer por completo algunas variaciones geográficas y por grupos de edad.

Sesgo de información

- Sesgo en el registro del dato: escaso. Algunos sueros utilizados en los ensayos de ELISA contaban con un reducido volumen, lo cual impidió hacer repeticiones o duplicaciones de los experimentos.
- Sesgo del instrumento: nulo o muy bajo. Para la determinación de los niveles de anticuerpos se utilizó un lector de microplacas de ELISA, el cual cuenta con un *software* con calibración adecuada para disminuir los sesgos que representan la utilización de instrumentos que no cuentan con la sensibilidad necesaria para medir la variable. Este equipo además permite la creación de curvas de calibración con medidas conocidas.
- Sesgo de notificación: nulo o muy bajo. En la recolección de la información de los participantes sin hallazgos clínicos de criptococosis puede que éstos no notificaran su real estado inmunológico y factores de riesgo.
- Sesgo de la técnica: escaso. Aunque la sensibilidad de la técnica de ELISA es muy buena para la determinación de la concentración de inmunoglobulinas totales, ya que utiliza estándares con concentraciones conocidas, dicha sensibilidad disminuye en el momento de detectar anticuerpos específicos, en especial en aquellas muestras de suero que tienen una concentración tan baja que no supera el límite de detección.

6.11. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos

Teniendo en cuenta la naturaleza del estudio de corte analítica, la primera parte del análisis consistió en la obtención de medidas de tendencia central con sus correspondientes intervalos de confianza para las variables cuantitativas. Para el caso de las variables cualitativas, la principal medida fue la frecuencia con su correspondiente porcentaje. La segunda parte consistió en el análisis bivariado donde por medio de tablas de contingencia se empleó la relación de probabilidades (*Odds ratio*) como medida de asociación con su correspondiente intervalo de confianza y valor de p .

Para el análisis descriptivo de las variables IgG, IgA e IgM totales de pacientes con criptococosis, se consideró el coeficiente de asimetría teniendo un estadístico $CA > 0$, lo cual significa que las variables IgG, IgA e IgM tienen una distribución asimétrica positiva a la derecha. También se tuvo en cuenta el coeficiente de curtosis teniendo el estadístico $CC > 0$, lo cual representa que las variables IgG, IgA e IgM tienen una distribución leptocúrtica. Para comprobar la normalidad de las variables dependientes se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de significancia del 5% (0,05).

Dada la no normalidad, para la comparación de cada variable independiente (estado VIH, edad, sexo, procedencia y agente etiológico (*C. neoformans* y *C. gattii*)) con las variables dependientes (IgG, IgA e IgM totales o específicas) se utilizó el estadístico de prueba U de Mann-Whitney como análisis bivariado. También se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) para evaluar la relación entre las diversas variables, incluyendo la edad y el diagnóstico o no de criptococosis, con y los niveles de anticuerpos totales y específicos.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATA versión 18.0, SPSS versión 25, la herramienta en línea EasyMedStat (versión 3.9; www.easymedstat.com) y el programa GraphPad Prism v 7.05. La significancia estadística se presenta de la siguiente manera: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$.

Con los resultados de este estudio se escribió el manuscrito MIOC-2022-0145: Becerra-Álvarez Paola, Escandón Patricia, Lizarazo Jairo, Quirós-Gómez Óscar, Firacative Carolina. “*Cryptococcus neoformans*- and *Cryptococcus gattii*-specific IgG, IgA and IgM differ among children and adults with and without cryptococcosis from Colombia”, el cual fue sometido para publicación en la revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, el 20 de junio de 2022 (Anexo 1).

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se clasificó el estudio como de riesgo mínimo según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para efectuar investigación en seres humanos en Colombia), ya que implicó, parcialmente, la extracción de muestras sanguíneas por venopunción que en condiciones normales no genera ningún perjuicio para los participantes del estudio. Se empleó un consentimiento informado por escrito (Anexo 2), el cual fue diligenciado y firmado en el momento de la obtención de las muestras de sangre de los sujetos del estudio que accedieron a participar o sus acudientes, en el caso de los menores de edad. Este documento incluye el uso de las muestras en este estudio, el almacenamiento de dichas muestras y su uso posterior en caso de que se llegaran a necesitar. Teniendo en cuenta la naturaleza del estudio y que se estaban manipulando muestras biológicas, todos los experimentos se llevaron a cabo en un laboratorio de bioseguridad tipo III (BSL3) del Grupo MICROS, de la Universidad del Rosario, sede Quinta de Mutis, donde se utilizaron los elementos de protección personal (EPP) requeridos y necesarios.

Las muestras de pacientes con criptococosis, en quienes no se llevó a cabo venopunción, fueron utilizadas con la aprobación del Comité Técnico de Investigación (CTIN) y el Comité Ético de Investigación (CEIN) del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia, protocolo CEMIN N° 37-2017 (Anexo 3).

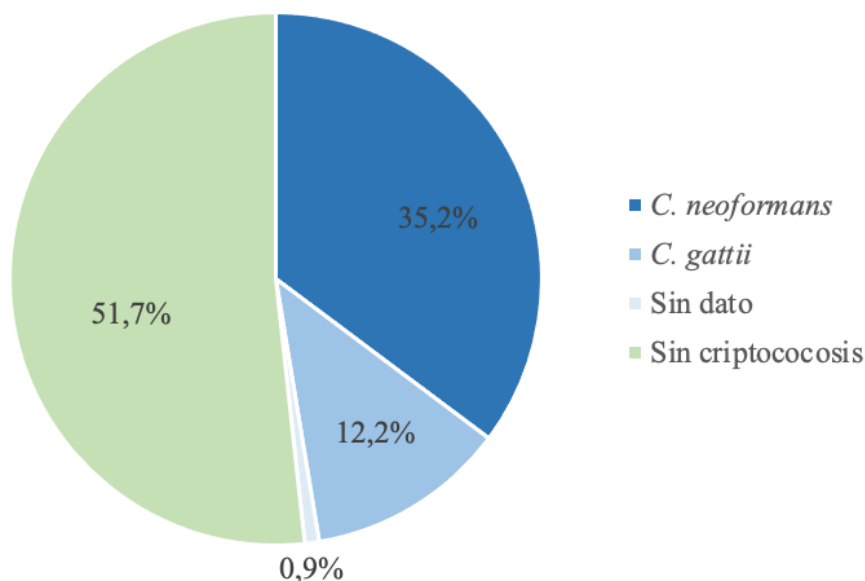
La identificación de todos los pacientes y personas de donde se obtuvieron las muestras de suero y sangre utilizadas en este estudio, fue anonimizada. El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad del Rosario (CEI - UR), protocolo DVO005 931-CV1073 (Anexo 4).

8. RESULTADOS

8.1. Características sociodemográficas

En total se analizaron 230 sueros sanguíneos de 111 (48,3%) pacientes con diagnóstico de criptococosis y de 119 (51,7%) personas sanas (Figura 4), quienes provenían de 7 departamentos de Colombia (Tabla 2). Del total de la población estudiada, el 65,2% se encontraba en edad adulta, el 25,2% eran niños, y el 9,6%, todos con criptococosis, no tenían dato de edad. En su mayoría, la población del estudio provenía de Bogotá y Norte de Santander. De los pacientes con criptococosis, 92 (82,9%) pertenecían al sexo masculino, 17 (15,3%) al sexo femenino, y dos (1,8%) no contaban con este dato. Entre las personas sanas, 42 (35,3%) eran hombres y el 77 (64,7%) mujeres (Tabla 2).

Figura 4. Distribución porcentual de los sueros de pacientes con y sin criptococosis en la población de estudio



Fuente: elaboración propia de los autores

Tabla 2. Distribución de la población de estudio por edad, sexo y procedencia

Variable		Con criptococosis n (%)	Sin criptococosis n (%)
Grupo de edad	Adulto	79 (71,2)	71 (59,7)
	Niño	10 (9,0)	48 (40,3)
	Sin dato	22 (19,8)	0 (0,0)
	Total	111 (100)	119 (100)
Sexo	Hombre	92 (82,9)	42 (35,3)
	Mujer	17 (15,3)	77 (64,7)
	Sin dato	2 (1,8)	0 (0,0)
	Total	111 (100)	119 (100)
Procedencia	Bogotá	62 (55,9)	82 (68,9)
	Norte de Santander	39 (35,1)	33 (27,7)
	Huila	5 (4,5)	0 (0,0)
	Magdalena	2 (1,8)	0 (0,0)
	Boyacá	1 (0,9)	4 (3,4)
	Bolívar	1 (0,9)	0 (0,0)
	Tolima	1 (0,9)	0 (0,0)
	Total	111 (100)	119 (100)

Fuente: elaboración propia de los autores

De los pacientes con criptococosis, 81 (73%) tenían un diagnóstico de criptococosis por *C. neoformans*, 28 (25,2%) por *C. gattii* y en dos (1,8%) pacientes no se determinó el agente etiológico (Figura 4). De los pacientes diagnosticados con *C. neoformans* y *C. gattii*, 54 (48,6%) y 1 (0,9%), respectivamente, tenían un sistema inmunológico comprometido con diagnóstico de VIH positivo (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de la población de estudio con criptococosis y diagnóstico de VIH

Estado VIH	<i>C. neoformans</i> n (%)	<i>C. gattii</i> n (%)	Sin dato n (%)	Total n (%)
VIH positivo	54 (48,6)	1 (0,9)	0 (0,0)	55 (49,5)
VIH negativo	15 (13,5)	23 (20,7)	0 (0,0)	38 (34,2)
Sin dato	12 (10,8)	4 (3,6)	2 (1,8)	18 (16,2)
Total	81 (72,9)	28 (25,2)	2 (1,8)	111 (100%)

Fuente: elaboración propia de los autores

8.2. Niveles de anticuerpos totales

De las 230 muestras incluidas en el estudio, se analizaron 228 muestras que presentaban datos completos; esto es, se excluyeron dos muestras de pacientes con criptococosis que carecían de datos acerca del estado VIH, sexo y agente etiológico (Tablas 2 y 3). De esta manera, se determinaron los niveles de anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) en adultos y niños de Colombia con diagnóstico de criptococosis (n=109) (Tabla 4) y sin diagnóstico de criptococosis (n=119) (Tabla 5). Debido al escaso volumen de algunas muestras de suero, no fue posible repetir algunos experimentos, por lo tal, no todas estas muestras tienen valores de IgG, IgA e IgM totales. En general, la producción de IgG total fue mayor en pacientes con criptococosis que en controles sanos (Tabla 6), independientemente del estado serológico respecto al VIH y de la edad. Por el contrario, los niveles séricos de IgA e IgM fueron generalmente más altos en los controles sanos que en los pacientes con criptococosis, independientemente de la edad (Tabla 6).

Tabla 4. Análisis descriptivo de anticuerpos totales en pacientes con criptococosis

	n	Media	Mínimo - Máximo	Asimetría		Curtosis	
				Estadístico	Desv. Error	Estadístico	Desv. Error
IgG (µg/ml)	109	13942,32	2156,00 - 53406,67	2,14	0,24	7,79	0,476
IgA (µg/ml)	105	488,13	53,22 - 3767,50	3,467	0,25	13,48	0,495
IgM (µg/ml)	109	775,69	118,17 - 2939,67	1,834	0,25	4,299	0,495

Fuente: elaboración propia de los autores

Tabla 5. Análisis descriptivo de anticuerpos totales en personas sin criptococosis

	n	Media	Mínimo - Máximo	Asimetría		Curtosis	
				Estadístico	Desv. Error	Estadístico	Desv. Error
IgG (µg/ml)	118	6459,91	1555,50 - 16796,67	0,908	0,233	0,188	0,442
IgA (µg/ml)	119	1564,53	114,27 - 5136,67	1,09	0,222	2,08	0,44
IgM (µg/ml)	119	1014,72	203,77 - 2831,50	1,05	0,222	0,772	0,44

Fuente: elaboración propia de los autores

Tabla 6. Comparación de anticuerpos totales entre la población con y sin criptococosis

Con criptococosis vs. Sin criptococosis			
	n	Media en $\mu\text{g/ml}$	Valor p
IgG	109 vs. 118	13942,32 vs. 6459,91	0,0001*
IgA	105 vs. 119	488,13 vs. 1564,53	0,0001*
IgM	109 vs. 119	775,69 vs. 1014,72	0,002*

* Diferencia estadísticamente significativa

Fuente: elaboración propia de los autores

Según la prueba de normalidad, la distribución de las variables IgG, IgA e IgM de pacientes con criptococosis y de personas sanas son diferentes a la distribución normal (Tabla 7 y Tabla 8).

Tabla 7. Pruebas de normalidad de anticuerpos totales en pacientes con criptococosis

	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
IgG ($\mu\text{g/ml}$)	0,127	109	0	0,850	109	0
IgA ($\mu\text{g/ml}$)	0,243	105	0	0,582	105	0
IgM ($\mu\text{g/ml}$)	0,154	109	0	0,834	109	0

Fuente: elaboración propia de los autores

Tabla 8. Pruebas de normalidad de anticuerpos totales en personas sin criptococosis

	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
IgG ($\mu\text{g/ml}$)	0,120	118	0	0,915	118	0
IgA ($\mu\text{g/ml}$)	0,098	119	0	0,937	119	0
IgM ($\mu\text{g/ml}$)	0,130	119	0	0,920	119	0

Fuente: elaboración propia de los autores

8.3. Asociación entre niveles de anticuerpos totales

En los pacientes con criptococosis se buscó una asociación entre los niveles de anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) utilizando el coeficiente de correlación de Spearman, con un nivel de significancia de 5% (0.05). El grado de asociación entre IgG e IgA fue de $\rho = -0.368$ lo que indica una asociación negativa, es decir, que a medida que aumenta el IgG, tiende a disminuir el IgA con un valor $p = 0.001$ que indica que existe correlación estadísticamente significativa. El grado de asociación entre IgG e IgM es de $\rho = -0.139$ indicando también una asociación negativa, con un valor $p = 0.0379$ que indica que existe correlación estadísticamente significativa. En cuanto a la correlación entre IgA e IgM, el grado de asociación es de $\rho = 0.451$, lo que indica una asociación positiva, es decir, a medida que aumenta el IgA, tiende a aumentar el IgM, con un valor $p = 0.001$ que indica que existe correlación estadísticamente significativa.

8.4. Análisis bivariado de anticuerpos totales

En los pacientes con criptococosis, se llevó a cabo la comparación de la media de cada variable dependiente (IgG, IgA e IgM) con las variables independientes (estado VIH, edad, sexo, procedencia y agente etiológico (*C. neoformans* y *C. gattii*)) utilizando el estadístico de prueba U de Mann-Whitney. De esta manera, se determinó que los niveles de IgG fueron más altos en pacientes VIH positivo en comparación con los VIH negativos, así como en adultos en comparación con niños, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Similarmente, los niveles de IgA e IgM fueron significativamente más altos en pacientes VIH positivo y los adultos presentaron niveles más altos tanto de IgA como de IgM que los niños. Los pacientes infectados por *C. neoformans* produjeron más IgG que los infectados por *C. gattii*, mientras que se encontró lo opuesto en la producción de IgM e IgA, aunque estas diferencias fueron significativas sólo para IgM. Los niveles totales de IgG, IgA e IgM en pacientes con criptococosis no difirieron en cuanto a las regiones geográficas (Bogotá vs. Norte de Santander) de donde provenían los pacientes ni entre hombres y mujeres (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis bivariado de anticuerpos totales en pacientes con criptococosis

Grupo (n)	IgG (µg/ml) Media (Valor p)	IgA (µg/ml) Media (Valor p)	IgM (µg/ml) Media (Valor p)
VIH+ vs. VIH- (55 vs. 38)	16381,58 vs. 11207,23 (0,006)*	585,72 vs. 402,60 (0,004)*	911,47 vs. 497,00 (0,001)*
Adulto vs. Niño (79 vs. 10)	14272,04 vs. 12579,98 (0,683)	541,68 vs. 199,35 (0,043)*	776,13 vs. 697,88 (0,002)*
Cn. vs. Cg. (81 vs. 28)	11558,87 vs. 10977,90 (0,037)*	263,86 vs. 493,07 (0,098)	464,81 vs 517,99 (0,025)*
Bogotá vs. N. Santander (62 vs. 39)	13100,01 vs. 12688,75 (0,726)	560,85 vs 392,16 (0,222)	882,85 vs. 720,13 (0,180)
Hombres vs. Mujeres (92 vs. 17)	13993,46 vs. 13666,12 (0,590)	518,69 vs. 329,97 (0,267)	795,69 vs. 667,50 (0,194)

*Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$.

Cn.: *C. neoformans*, Cg.: *C. gattii*. N. Santander: Norte de Santander

Fuente: elaboración propia de los autores

En las personas sin criptococosis, también se llevó a cabo la comparación de la media de cada variable dependiente (IgG, IgA e IgM) con las variables independientes (edad, sexo y procedencia) utilizando el estadístico de prueba U de Mann-Whitney. De esta manera, se determinó que los niveles totales de IgG fueron similares en niños y adultos sanos, mientras que IgA fue superior en adultos e IgM en niños. Por otro lado, los niveles totales de IgG fueron más altos en pacientes de Bogotá que de Norte de Santander y los niveles totales de IgM fueron más altos en mujeres que en hombres (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis bivariado de anticuerpos totales en personas sin criptococosis

Grupo (n)	IgG (µg/ml) Media (Valor p)	IgA (µg/ml) Media (Valor p)	IgM (µg/ml) Media (Valor p)
Adulto vs. Niño (71 vs. 48)	6611,76 vs. 6238,45 (0,562)	1738,88 vs. 1306,64 (0,006)*	919,50 vs. 1155,56 (0,022)*
Bogotá vs. N. Santander (82 vs. 33)	7211,29 vs. 4821,88 (0,001)*	1645,13 vs. 1408,78 (0,187)	1027,92 vs. 972,11 (0,631)
Hombres vs. Mujeres (42 vs. 77)	5673,99 vs. 6878,38 (0,067)	1738,16 vs. 1469,38 (0,101)	866,03 vs. 1095,82 (0,031)*

*Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$

N. Santander: Norte de Santander

Fuente: elaboración propia de los autores

8.5. Niveles de anticuerpos específicos

Los niveles de anticuerpos IgG, IgA e IgM específicos, es decir, que son reactivos contra proteínas totales de *C. neoformans* (Cn) y *C. gattii* (Cg), fueron determinados tanto en pacientes con diagnóstico de criptococosis como en personas sin diagnóstico de criptococosis, según la densidad óptica (OD por su sigla en inglés *Optical Density*) medida a través de pruebas de reacción antígeno-anticuerpo (ver sección 6.8 o Anexo 1). Nuevamente, debido al escaso volumen de algunas muestras de suero, no fue posible repetir algunos experimentos, por lo tal, no todas estas muestras tienen valores de IgG, IgA e IgM específicos. En general, la reactividad promedio de IgG, IgA e IgM con proteínas de *C. neoformans* fue mayor en sueros de pacientes con criptococosis, mientras que la reactividad promedio de IgA e IgM con proteínas de *C. gattii* fue mayor en sueros de personas sanas, aunque estas diferencias no tuvieron siempre significancia estadística (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de anticuerpos específicos entre la población con y sin criptococosis

	Con criptococosis vs. Sin criptococosis		
	n	(Media de OD)	Valor p
Cn-IgG	109 vs. 119	1,94 vs. 1,78	0,322
Cg-IgG	109 vs. 119	1,61 vs. 1,57	0,810
Cn-IgA	106 vs. 119	1,19 vs. 0,66	0,0001*
Cg-IgA	106 vs. 119	0,91 vs. 1,04	0,368
Cn-IgM	106 vs. 119	1,18 vs. 1,02	0,168
Cg-IgM	106 vs. 119	0,53 vs. 0,70	0,067

* Diferencia estadísticamente significativa

Cn.: *C. neoformans*, Cg.: *C. gattii*.

Fuente: elaboración propia de los autores

Sin embargo, la reactividad promedio de IgG e IgM fue significativamente mayor con proteínas de *C. neoformans* que de *C. gattii*, no solo en sueros de pacientes con criptococosis sino también en sueros de personas sanas. No obstante, aunque en pacientes con criptococosis la reactividad de IgA

con proteínas de *C. neoformans* también fue significativamente mayor que la reactividad de este anticuerpo con proteínas de *C. gattii*, en personas sanas IgA reaccionó significativamente más con proteínas de *C. gattii* que con proteínas de *C. neoformans* (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de anticuerpos específicos *Cn* vs. *Cg* en la población con y sin criptococosis

	Con criptococosis OD [IC95%]	Valor <i>p</i>	Sin criptococosis OD [IC95%]	Valor <i>p</i>
<i>Cn</i> -IgG	1,94 [1,697 - 2,177]	0,0130*	1,78 [1,576 - 1,979]	0,0205*
<i>Cg</i> -IgG	1,61 [1,355 - 1,855]		1,57 [1,374 - 1,760]	
<i>Cn</i> -IgA	1,19 [0,945 - 1,434]	0,0333*	0,66 [0,541 - 0,788]	0,0009*
<i>Cg</i> -IgA	0,91 [0,691 - 1,130]		1,04 [0,872 - 1,200]	
<i>Cn</i> -IgM	1,18 [0,989 - 1,371]	<0,0001*	1,02 [0,902 - 1,144]	0,0021*
<i>Cg</i> -IgM	0,53 [0,404 - 0,663]		0,7 [0,579 - 0,826]	

IC 95%: Intervalo de confianza de 95%. * Diferencia estadísticamente significativa
Cn.: *C. neoformans*, *Cg.*: *C. gattii*. OD: densidad óptica

Fuente: elaboración propia de los autores

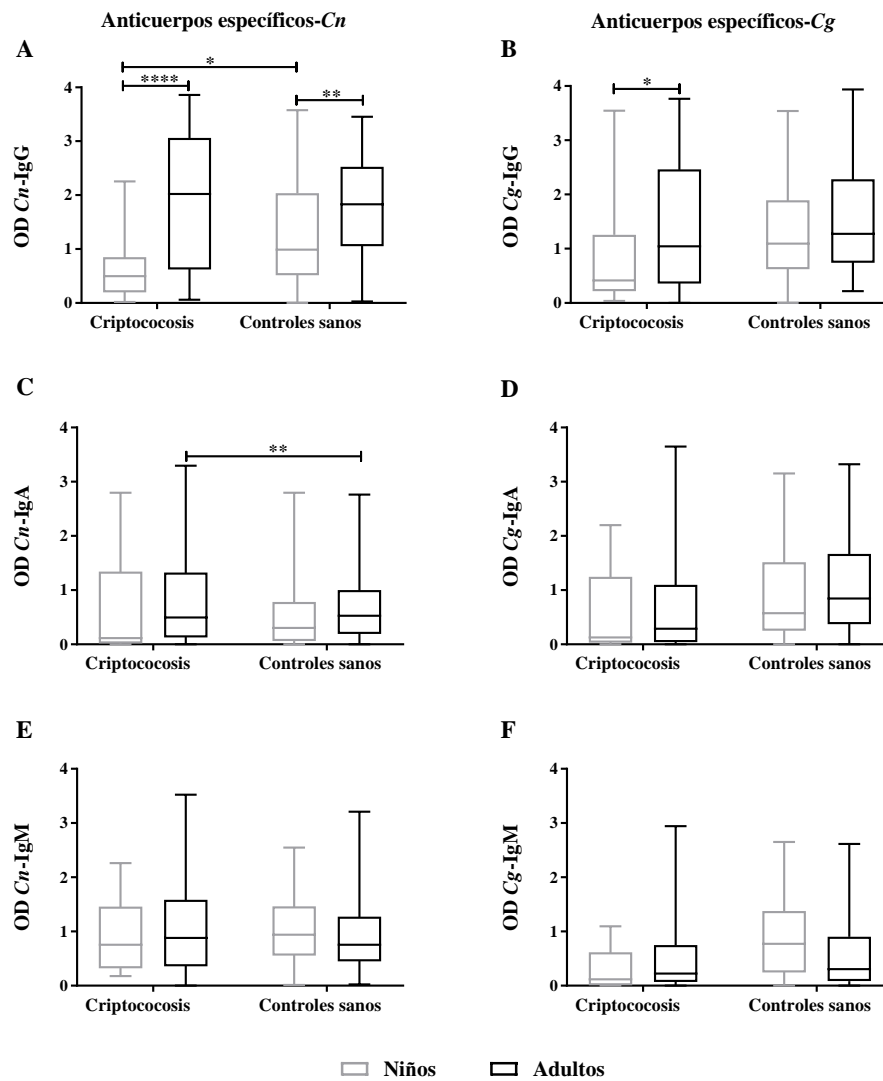
Adicionalmente, en toda la población estudiada, hubo una fuerte correlación lineal positiva entre la reactividad de los anticuerpos con proteínas de *C. neoformans* y la reactividad de los anticuerpos con proteínas de *C. gattii*, de acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). Relación *Cn*-IgG con *Cg*-IgG ($\rho = 0.6$ y $p < 0.0001$), relación *Cn*-IgA con *Cg*-IgA ($\rho = 0.94$ y $p < 0.0001$) y relación *Cn*-IgM con *Cg*-IgM ($\rho = 0.92$ y $p < 0.0001$).

8.6. Análisis bivariado de anticuerpos específicos

En los grupos estudiados, se llevó a cabo la comparación de la media de la OD, la cual indica el nivel de anticuerpos específicos contra proteínas de *C. neoformans* o de *C. gattii*, con respecto a la edad de los pacientes, utilizando el estadístico de prueba U de Mann-Whitney. En general, las OD de IgG específicas contra las proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii* fueron más altas en adultos que en niños, con y sin diagnóstico de criptococosis (Figuras 5A y 5B), aunque las diferencias no siempre fueron estadísticamente significativas. De manera similar, las OD para IgA específicas

(Figuras 5C y 5D) e IgM (Figuras 5E y 5F) contra las proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii* tendieron a ser más altas en adultos, en comparación con los niños, aunque ninguna de estas diferencias tuvo significación estadística.

Figura 5. Anticuerpos específicos en la población de estudio



Diferencia estadísticamente significativa: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, y **** $p \leq 0.0001$
Cn.: *C. neoformans*, *Cg.*: *C. gattii*

Fuente: elaboración propia de los autores

De acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) se encontró además una correlación lineal positiva entre la IgG específica y la edad ($\rho \leq 0,22$ y $p \leq 0,05$), pero no se encontró correlación estadísticamente significativa entre las IgA específicas o las IgM específicas y la edad ($\rho \leq 0,1$ y $p > 0,05$).

Independientemente de la especie de *Cryptococcus*, la reactividad de los anticuerpos específicos IgG, IgA e IgM no difirió entre adultos con criptococosis y adultos sanos, ni entre niños de ambos grupos ($p > 0,05$). En pacientes con criptococosis, las IgG, IgA e IgM específicas frente a proteínas de *C. neoformans* y *C. gattii* no difirieron con el estado inmunológico (VHI positivo vs. VIH negativo), el sexo, la especie causante de la infección ni con la región geográfica ($p > 0,05$).

8.7. Asociación entre anticuerpos totales y específicos

En todos los sueros de adultos y niños, tanto con criptococosis como sin criptococosis, se encontró una correlación lineal positiva entre los niveles totales y específicos de cada anticuerpo IgG, IgA e IgM, independientemente de la especie de *Cryptococcus* de la que se extrajeron las proteínas. Sin embargo, la significación estadística de la correlación difirió entre los anticuerpos (Tabla 13).

Tabla 13. Correlación entre anticuerpos totales y específicos en la población de estudio

Correlación	Con criptococosis		Sin criptococosis	
	ρ	Valor p	ρ	Valor p
Cn-IgG e IgG total	0,097	0,322	0,242	0,009*
Cg-IgG e IgG total	0,102	0,294	0,130	0,162
Cn-IgA e IgA total	0,161	0,105	0,187	0,042*
Cg-IgA e IgA total	0,109	0,276	0,234	0,01*
Cn-IgM e IgM total	0,323	0,001*	0,237	0,01*
Cg-IgM e IgM total	0,347	0,0001*	0,176	0,056

*Diferencia estadísticamente significativa

Cn.: *C. neoformans*, Cg.: *C. gattii*

Fuente: elaboración propia de los autores

8.8. Asociación entre las variables sociodemográficas y clínicas de adultos y niños colombianos con y sin diagnóstico de criptococosis, con los niveles de anticuerpos totales y específicos de dicha población de estudio.

Se exploró la asociación entre las variables “niveles totales y específicos de cada anticuerpo IgG, IgA e IgM” con las variables “edad, sexo y procedencia”. Para el análisis de regresión logística binaria se tomaron los registros válidos para cada una de éstas, al excluir los datos perdidos.

Al evaluar la asociación de presentar o no criptococosis con los niveles de anticuerpos totales, se encontró que la producción total de IgG y de IgA se asocia con la presentación de la enfermedad, mientras que no se asocia con la producción total de IgM (Tabla 14). Por otra parte, los anticuerpos IgA e IgM específicos, independientemente de la especie de *Cryptococcus* causando la infección, indican que su presencia si se asocia con esta micosis. Sin embargo, existe una mayor asociación entre presentar criptococosis y el nivel de anticuerpos IgA e IgM específicos contra *C. neoformans* que la asociación que existe entre presentar criptococosis y el nivel de anticuerpos IgA e IgM específicos contra *C. gattii*, como se puede ver con los valores OR (85,126 vs. 0,016 para IgA y 4,454 vs. 0,104 para IgM) (Tabla 15).

Tabla 14. Asociación entre presentar o no criptococosis con anticuerpos totales

Variable	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp (B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
IgG (µg/ml)	0,000	0,000	36,964	1	0,000*	1,000	1,000	1,001
IgA (µg/ml)	-0,002	0,000	32,300	1	0,000*	0,998	0,997	0,998
IgM (µg/ml)	0,000	0,000	0,012	1	0,913	1,000	0,999	1,001
Constante	-1,679	0,628	7,136	1	0,008	0,187	-	-

*Diferencia estadísticamente significativa

Fuente: elaboración propia de los autores

Tabla 15. Asociación entre presentar o no criptococosis con anticuerpos específicos

Variable	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp (B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Cn-IgG	-0,089	0,181	0,239	1	0,625	0,915	0,641	1,306
Cg-IgG	0,055	0,193	0,082	1	0,774	1,057	0,724	1,544
Cn-IgA	4,444	0,729	37,203	1	0,000*	85,126	20,411	355,027
Cg-IgA	-4,129	0,693	35,490	1	0,000*	0,016	0,004	0,063
Cn-IgM	1,494	0,428	12,162	1	0,000*	4,454	1,924	10,313
Cg-IgM	-2,266	0,576	15,463	1	0,000*	0,104	0,034	0,321
Constante	-0,551	0,382	2,084	1	0,149	0,576	-	-

*Diferencia estadísticamente significativa

Cn.: *C. neoformans*, Cg.: *C. gattii*

Fuente: elaboración propia de los autores

Con respecto al sexo de los pacientes con criptococosis y de las persona sanas, no se observó ninguna asociación con el nivel de anticuerpos totales. Sin embargo, se observó que pertenecer al sexo masculino deriva en una mayor asociación con los niveles de anticuerpos específicos IgA e IgM (Tabla 16). Para IgA específico contra proteínas de *C. neoformans* se encontró una mayor probabilidad de presentar niveles altos comparado con los valores de IgA específico contra proteínas de *C. gattii* (OR 3,014 vs. 0,487) (Tabla 16).

Tabla 16. Asociación entre ser del sexo masculino o femenino con anticuerpos específicos

Variable	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp (B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Cn-IgG	-0,280	0,147	3,654	1	0,056	0,755	0,567	1,007
Cg-IgG	0,081	0,152	0,283	1	0,595	1,084	0,804	1,462
Cn-IgA	1,103	0,297	13,804	1	,000*	3,014	1,684	5,393
Cg-IgA	-0,719	0,270	7,121	1	,008*	0,487	0,287	0,826
Cn-IgM	0,126	0,295	0,183	1	0,669	1,135	0,636	2,023
Cg-IgM	-0,757	0,353	4,591	1	0,032*	0,469	0,235	0,937
Constante	0,791	0,319	6,134	1	0,013	2,205		

*Diferencia estadísticamente significativa

Cn.: *C. neoformans*, Cg.: *C. gattii*

Fuente: elaboración propia de los autores

Con respecto a la edad de los pacientes con criptococosis y de las persona sanas, no se observó ninguna asociación con el nivel de anticuerpos totales. Sin embargo, se observó una asociación entre ser adulto con mayor niveles de anticuerpos específicos IgG contra *C. neoformans* y mayor niveles de anticuerpos específicos IgM contra *C. gattii*. Para IgA, se encontró una asociación entre ser adulto y tener mayor nivel de anticuerpos específicos, independiente de la especie, pero con mayor probabilidad para *C. gattii* (OD 2,046 vs. 0,310) (Tabla 17).

Tabla 17. Asociación entre ser adulto o niño con anticuerpos específicos

Variable	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp (B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
<i>Cn</i> -IgG	-1,031	0,249	17,133	1	0,000*	0,357	0,219	0,581
<i>Cg</i> -IgG	0,263	0,219	1,442	1	0,230	1,300	0,847	1,996
<i>Cn</i> -IgA	-1,171	0,452	6,705	1	0,010*	0,310	0,128	0,752
<i>Cg</i> -IgA	0,716	0,360	3,952	1	0,047*	2,046	1,010	4,144
<i>Cn</i> -IgM	-0,542	0,406	1,781	1	0,182	0,581	0,262	1,289
<i>Cg</i> -IgM	1,556	0,434	12,838	1	0,000*	4,739	2,023	11,099
Constante	-0,386	0,402	0,923	1	0,337	0,680	-	-

*Diferencia estadísticamente significativa

Cn.: *C. neoformans*, *Cg.*: *C. gattii*

Fuente: elaboración propia de los autores

Con respecto a la procedencia de los pacientes con criptococosis y de las personas sanas, Bogotá y Norte de Santander, no se observó ninguna asociación con el nivel de anticuerpos totales. Por otro lado, si bien se planteó realizar el análisis de la asociación entre las variables sociodemográficas de procedencia con los anticuerpos específicos para *C. neoformans* y *C. gattii*, la prueba ómnibus de coeficientes de modelo no presentó una diferencia significativa que permitiera interpretar el modelo logístico (Tabla 18).

Tabla 18. Asociación entre provenir de Bogotá o Norte de Santander con anticuerpos específicos

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso	6,237	6	0,397
Bloque	6,237	6	0,397

Fuente: elaboración propia de los autores

9. DISCUSIÓN

El papel de la inmunidad humoral frente a la criptococosis sigue siendo incierto. Sin embargo, varios anticuerpos, predominantemente IgG, que son reactivos con GXM, melanina y con diversas proteínas criptocócicas, han sido identificados desde ya hace algún tiempo, no solo en pacientes con criptococosis sino también en huéspedes sin manifestaciones clínicas o sin antecedentes de infección criptocócica previa (54, 55, 68). Nuestro estudio apoya estos hallazgos, ya que muestra que no solo la IgG sérica, sino también los anticuerpos IgA e IgM reaccionan con antígenos proteicos tanto de *C. neoformans* como de *C. gattii*, y que estos anticuerpos están presentes no solo en sueros de adultos con y sin infección criptocócica, sino también en sueros de niños con criptococosis, cuyos casos son muy poco comunes de encontrar, así como en sueros de niños sanos.

Al igual que otros estudios, en la cohorte de Colombia, los pacientes con criptococosis con VIH presentaron niveles significativamente más altos de IgG, IgA e IgM totales en comparación de aquellos pacientes sin infección por VIH, lo que podría estar relacionado con los defectos en la inmunidad mediada por células y la hipergammaglobulinemia que son notorios en personas infectadas con VIH (69-71). En particular, los pacientes con criptococosis causada por *C. neoformans* produjeron niveles mucho más altos de todos los anticuerpos, en comparación con los pacientes infectados por *C. gattii*, lo que se correlaciona con la proporción de personas infectadas por el VIH afectadas por cada especie, que, en nuestro estudio, representaron el 66,7% y el 3,6% de los casos, respectivamente. A nivel mundial, los casos de infección por *C. gattii* que afectan a pacientes con VIH se reportan raramente, como ocurre en Colombia (72-74). Además, al analizar pacientes con criptococosis, pero sin VIH, los niveles de IgG, IgA e IgM no difirieron entre los pacientes afectados con uno u otro agente etiológico.

Mientras que los niveles totales de IgG fueron mucho más bajos en nuestros pacientes sanos, los niveles totales de IgA e IgM parecen disminuir significativamente durante la criptococosis, independientemente del estado del VIH, lo que contrasta con otros informes. Sin embargo, la relación entre los niveles séricos de inmunoglobulinas y el VIH podría diferir entre los estudios,

no solo por la metodología utilizada para medir las concentraciones de anticuerpos, sino también porque la respuesta inmune que depende de la etapa clínica de la infección por VIH de los pacientes, que se desconoce en nuestro estudio, así como del efecto de la criptococosis en sí y del agente etiológico causante de la micosis (63, 71, 75, 76).

La reactividad de los anticuerpos IgG, IgA e IgM contra proteínas criptocócicas específicas, que se correlacionaron directamente con los niveles totales de IgG, IgA e IgM, respectivamente, tendió a ser mayor en pacientes con criptococosis en comparación con personas sanas. Aunque estas diferencias no siempre fueron estadísticamente significativas, éstas pueden ser reales, verdaderas y quizás clínicamente relevantes (77, 78). Las proteínas criptocócicas podrían provocar un nivel más alto de anticuerpos específicos durante la infección, lo cual ha sido reportada por otros investigadores, no solo en la criptococosis murina sino también en la infección en humanos (53, 56, 57, 63, 79). A largo plazo, el análisis de las respuestas IgG, IgA e IgM a proteínas criptocócicas específicas podría ayudar a identificar antígenos inmunodominantes que son protectores, no protectores o perjudiciales durante la criptococosis. Se sabe que, dependiendo del isotipo, la especificidad e incluso los factores del huésped, ciertos anticuerpos pueden alterar el curso de una infección fúngica en beneficio o daño del huésped (76, 80).

Al comparar la reactividad de IgG, IgA e IgM con antígenos proteicos de cada uno de los principales agentes etiológicos de la criptococosis, encontramos que todas las inmunoglobulinas séricas reaccionan significativamente más con las proteínas *C. neoformans* que con las proteínas de su especie hermana, *C. gattii*. Suponiendo que hay exposición ambiental, estos hallazgos concuerdan con el hecho de que, no solo en Colombia, sino a nivel mundial, *C. neoformans* prevalece en nichos ecológicos sobre *C. gattii* (1, 5, 74). En Australia y Papúa Nueva Guinea, donde las infecciones por *C. gattii* son mucho más comunes que las de *C. neoformans* (73, 81), se han reportado algunas diferencias sero-epidemiológicas que dependen del agente etiológico causante de la infección. Los pacientes con criptococosis por *C. gattii* procedentes de Australia presentaron niveles más altos y una mayor prevalencia de IgG e IgA frente a GXM que aquellos con infección por *C. neoformans*, posiblemente porque *C. gattii* es más inmunogénico y la

infección tarda más en ser diagnosticada (54). Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, el estudio en Australia no determinó la prevalencia de anticuerpos contra proteínas específicas de *C. gattii*, sino solo contra antígenos polisacáridos de *C. neoformans*, lo que podría generar reactividad cruzada y resultados sesgados. En Papúa Nueva Guinea, se informó que los adultos con meningitis por *C. gattii* tenían niveles más altos de IgG contra antígenos de proteínas no capsulares de la misma especie en comparación con niños y pacientes sanos (82), lo cual es comparable con un hallazgo notable en nuestro estudio. En la cohorte colombiana, las inmunoglobulinas séricas, especialmente IgG, de adultos con criptococosis y sanos, tendieron a ser más reactivas con las proteínas criptocócicas que las inmunoglobulinas de niños con criptococosis y sanos, respectivamente, con la observación de que la reactividad de anticuerpos aumenta con la edad. En conjunto, nuestros hallazgos apoyan la idea de que, desde la infancia, las personas están constantemente inmunizadas por la exposición crónica de ambas especies criptocócicas, principalmente *C. neoformans*. El hallazgo de IgG, IgA e IgM específicas contra proteínas criptocócicas en sueros de personas sanas de tan solo 1 año, permitió además estimar que, en Colombia, los niños están expuestos al hongo a una edad muy temprana, de manera similar que lo reportado en el Bronx en Nueva York, donde los sueros IgG de niños entre 1,1 a 2 años de edad fueron el grupo más joven que demostró reactividad contra proteínas de *C. neoformans* (6).

Aunque se ha reportado que la prevalencia de infección asintomática por *C. neoformans* en niños varía geográficamente, explicada posiblemente por una asociación con diferencias en la exposición ambiental a la levadura (60), en nuestro estudio no se encontraron diferencias serológicas entre pacientes de Bogotá y Norte de Santander, a pesar de la diferencia significativa entre la incidencia de criptococosis en estas dos regiones (8), lo cual podría deberse a otros factores, como las características del huésped.

Las observaciones generales de nuestro estudio, con respecto a las respuestas diferenciales de IgG, IgA e IgM a los antígenos proteicos, tanto de *C. neoformans* como de *C. gattii* en pacientes con criptococosis y personas sanas en diferentes grupos de edad, podrían tener implicaciones importantes para la prevención y el tratamiento de la criptococosis. Se pueden realizar estudios

proteómicos adicionales para identificar proteínas reactivas que son específicas de la enfermedad, específicas de la especie y/o específicas de la edad, y que pueden evaluarse para el desarrollo de estrategias de vacunas no solo para la prevención de la criptococosis, sino también con el objetivo de controlar la reactivación de esta micosis, ya que la exposición ambiental a las levaduras ocurre desde la infancia. Como ya se ha sugerido previamente, la respuesta de las células B y los anticuerpos son necesarios en el aclaramiento normal de las células criptocócicas en el cuerpo (83), por lo tal, es posible que las respuestas específicas de IgG, IgA e IgM a los antígenos proteicos puedan ser también importantes, de manera similar a la producción de anticuerpos contra el polisacárido capsular principal GXM, que se ha correlacionado con un mejor pronóstico tanto en las infecciones por *C. neoformans* como aquellas causadas por *C. gattii* (84, 85).

10. LIMITACIONES Y CONCLUSIONES

10.1. Limitaciones

La ausencia de algunos datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes hizo que los análisis y comparaciones hechas no siempre tuvieran el mismo número de datos. Por otro lado, el volumen de suero limitado en algunos casos impidió que todos los pacientes contaran con datos del nivel de anticuerpos totales y específicos y tampoco permitió que se hiciera la titulación de los sueros, lo cual aumenta la sensibilidad de la detección de dichos anticuerpos. Actualmente no existe otra técnica, comparable en costos y en facilidad con la técnica de ELISA, que permita la detección de anticuerpos específicos contra proteínas totales de hongos. La inclusión de pacientes principalmente de Bogotá y Norte de Santander impidió que se pudieran analizar datos de otras regiones del país. El pequeño número de casos de criptococosis en niños limita que se puedan incluir un número más grandes de pacientes de este grupo de edad.

Los controles no están relacionadas con los casos, debido a que la población caso (con criptococosis) fue tomada de manera retrospectiva mientras que la población control fue prospectiva (sin criptococosis). Para el análisis de regresión lineal se tomaron los registros válidos para cada variable, excluyendo los datos perdidos. No se pudo realizar un análisis con la variable VIH debido a que la población control no presentaban esta condición.

10.2. Conclusiones

En pacientes colombianos con criptococosis, los niveles de inmunoglobulinas séricas, totales y específicas, difieren con respecto a las personas sanas. En general, la producción de IgG total fue mayor en pacientes con criptococosis que en controles sanos, independientemente del estado serológico respecto al VIH y de la edad, mientras que los niveles séricos de IgA e IgM fueron generalmente más altos en los controles sanos que en los pacientes con criptococosis,

independientemente de la edad. Por otro lado, los niveles de inmunoglobulinas séricas difieren según el estado del VIH, como se ha informado anteriormente. Sin embargo, este estudio muestra por primera vez variaciones en la producción de inmunoglobulinas específicas entre adultos y niños con enfermedad criptocócica, así como en personas sanas, y variación entre la reactividad con antígenos proteicos de *C. neoformans* y *C. gattii*, los cuales son los principales causantes de la infección. Estos resultados aportan información sero-epidemiológica importante para el entendimiento y estudio de esta micosis de importancia en Salud Pública y sus agentes etiológicos. La reactividad diferencial de anticuerpos con proteínas criptocócicas reportadas en esta tesis, tanto de adultos como de niños con y sin diagnóstico de criptococosis, aporta datos que pueden llevar a reevaluar el estudio de la inmunidad humoral y su papel para la defensa del huésped contra la criptococosis.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(7):a019760. DOI: 10.1101/cshperspect.a019760.
2. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. Lancet Infect Dis. 2017;17(8):873-81. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
3. Chen SC, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. Clin Microbiol Rev. 2014;27(4):980-1024. DOI: 10.1128/CMR.00126-13.
4. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2009;77(10):4345-55. DOI: 10.1128/IAI.00542-09.
5. Mitchell TG, Castañeda E, Nielsen K, Wanke B, Lazéra MS. Environmental Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung JK, Perfect JR, Casadevall A, editors. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 237-59.
6. Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski L, Niang R, et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. Pediatrics. 2001;107(5):E66.
7. Dromer F, Casadevall A, Perfect J, Sorrell T. *Cryptococcus neoformans*: Latency and Disease. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung JK, Perfect JR, Casadevall A, editors. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 431-40.
8. Escandón P, Lizarazo J, Agudelo CI, Castañeda E. Cryptococcosis in Colombia: compilation and analysis of data from laboratory-based surveillance. J Fungi (Basel). 2018;4(1). DOI: 10.3390/jof4010032.
9. Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobon A, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: results of the national surveillance program for the years 2006-2010. Biomedica. 2012;32(3):386-98. DOI: 10.1590/S0120-41572012000300009.

10. Granados DP, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. FEMS Yeast Res. 2006;6(4):636-44. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00090.x.
11. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(1):179-206. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.006.
12. Yang DH, England MR, Salvator H, Anjum S, Park YD, Marr KA, et al. *Cryptococcus gattii* species complex as an opportunistic pathogen: underlying medical conditions associated with the infection. mBio. 2021;12(5):e0270821. DOI: 10.1128/mBio.02708-21.
13. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. Infection. 2007;35(2):51-8. DOI: 10.1007/s15010-007-6142-8.
14. Sanfelice F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. Ann d'Igiene. 1984;4:463-95.
15. Busse O. Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. Zentralbl f Bakt. 1894;16:175-80.
16. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. Washington, DC: ASM Press; 2011.
17. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The case for adopting the "Species Complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. mSphere. 2017;2(1). DOI: 10.1128/mSphere.00357-16.
18. Benham RW. Cryptococcosis and blastomycosis. . Ann N Y Acad Sci 1950;50:1299-314.
19. Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia. 1975;67(6):1197-200.
20. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. Antonie van Leeuwenhoek. 1982;48(1):25-38.
21. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol. 1999;37(3):838-40. DOI: 10.1128/JCM.37.3.838-840.1999.

22. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006;6(4):574-87. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x.
23. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. Fungal Genet Biol. 2015;78:16-48. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.
24. Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17258-63. DOI: 10.1073/pnas.0402981101.
25. MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. Emerg Infect Dis. 2007;13(1):42-50. DOI: 10.3201/eid1301.060827.
26. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. Appl Environ Microbiol. 2007;73(5):1433-43. DOI: 10.1128/AEM.01330-06.
27. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):515-48.
28. Chang CC, Sorrell TC, Chen SC. Pulmonary Cryptococcosis. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(5):681-91. DOI: 10.1055/s-0035-1562895.
29. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2006;20(3):507-44, v-vi. DOI: 10.1016/j.idc.2006.07.001.
30. La Hoz RM, Pappas PG. Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. Drugs. 2013;73(6):495-504. DOI: 10.1007/s40265-013-0037-z.
31. Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2002;16(4):837-74, v-vi.
32. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2010;50(3):291-322. DOI: 10.1086/649858.

33. Torres RG, Etchebehere RM, Adad SJ, Micheletti AR, Ribeiro BM, Silva LE, et al. Cryptococcosis in acquired immunodeficiency syndrome patients clinically confirmed and/or diagnosed at necropsy in a teaching hospital in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(4):781-5. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0148.
34. Sun HY, Wagener MM, Singh N. Cryptococcosis in solid-organ, hematopoietic stem cell, and tissue transplant recipients: evidence-based evolving trends. *Clin Infect Dis.* 2009;48(11):1566-76. DOI: 10.1086/598936.
35. Yu JQ, Tang KJ, Xu BL, Xie CM, Light RW. Pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(6):531-9. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.07.004.
36. Firacative C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e200430. DOI: 10.1590/0074-02760200430.
37. Abadi J, Nachman S, Kressel AB, Pirofski L. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1999;28(2):309-13. DOI: 10.1086/515130.
38. Severo CB, Xavier MO, Gazzoni AF, Severo LC. Cryptococcosis in children. *Paediatr Respir Rev.* 2009;10(4):166-71. DOI: 10.1016/j.prrv.2009.06.009.
39. Lizarazo J, Escandón P, Agudelo CI, Castañeda E. Cryptococcosis in Colombian children and literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(6):797-804.
40. Byrnes EJ, 3rd, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect.* 2011;13(11):895-907. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.05.009.
41. Lortholary O, Fontanet A, Memain N, Martin A, Sitbon K, Dromer F, et al. Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome complicating HIV-associated cryptococcosis in France. *AIDS.* 2005;19(10):1043-9. DOI: 10.1097/01.aids.0000174450.70874.30.
42. Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis.* 2000;31(2):499-508. DOI: 10.1086/313992.

43. Callejas A, Ordonez N, Rodriguez MC, Castaneda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol.* 1998;36(5):341-4.
44. Firacative C, Torres G, Rodriguez MC, Escandon P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cucuta, Colombia. *Biomedica.* 2011;31(1):118-23. DOI: 10.1590/S0120-41572011000100014.
45. Firacative C, Meyer W, Castañeda E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Latin America: a map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. *J Fungi (Basel).* 2021;7(4). DOI: 10.3390/jof7040282.
46. Lizarazo J, Castañeda E. Consideraciones sobre la criptococosis en los pacientes con sida. *Infectio.* 2012;16(S3):94-9. DOI: 10.1016/S0123-9392(12)70032-2.
47. Lizarazo J, Escandon P, Agudelo CI, Firacative C, Meyer W, Castaneda E. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997-2011. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(11):e3272. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003272.
48. Vecchiarelli A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000;38(6):407-17.
49. Zhang Y, Wang F, Tompkins KC, McNamara A, Jain AV, Moore BB, et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2489-500. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090530.
50. Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclere A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *mBio.* 2015;6(2). DOI: 10.1128/mBio.02580-14.
51. Price MS, Perfect JR. Host defenses against cryptococcosis. *Immunol Invest.* 2011;40(7-8):786-808. DOI: 10.3109/08820139.2011.605196.
52. Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* 2015;10(4):565-81. DOI: 10.2217/fmb.14.132.

53. Chen LC, Goldman DL, Doering TL, Pirofski L, Casadevall A. Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. *Infect Immun*. 1999;67(5):2218-24.
54. Speed BR, Kaldor J, Cairns B, Pegorer M. Serum antibody response to active infection with *Cryptococcus neoformans* and its varieties in immunocompetent subjects. *J Med Vet Mycol*. 1996;34(3):187-93.
55. Abadi J, Pirofski L. Antibodies reactive with the cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan are present in sera from children with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1999;180(3):915-9. DOI: 10.1086/314953.
56. Chaturvedi AK, Weintraub ST, Lopez-Ribot JL, Wormley FL, Jr. Identification and characterization of *Cryptococcus neoformans* protein fractions that induce protective immune responses. *Proteomics*. 2013;13(23-24):3429-41. DOI: 10.1002/pmic.201300213.
57. Chaturvedi AK, Hameed RS, Wozniak KL, Hole CR, Leopold Wager CM, Weintraub ST, et al. Vaccine-mediated immune responses to experimental pulmonary *Cryptococcus gattii* infection in mice. *PLoS One*. 2014;9(8):e104316. DOI: 10.1371/journal.pone.0104316.
58. Jobbins SE, Hill CJ, D'Souza-Basseal JM, Padula MP, Herbert BR, Krockenberger MB. Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. *J Proteome Res*. 2010;9(8):3832-41. DOI: 10.1021/pr100028t.
59. Firacative C, Gressler AE, Schubert K, Schulze B, Muller U, Brombacher F, et al. Identification of T helper (Th)1- and Th2-associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. *Sci Rep*. 2018;8(1):2681. DOI: 10.1038/s41598-018-21039-z.
60. Davis J, Zheng WY, Glatman-Freedman A, Ng JA, Pagcatipunan MR, Lessin H, et al. Serologic evidence for regional differences in pediatric cryptococcal infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(6):549-51. DOI: 10.1097/INF.0b013e318047e073.
61. Martins LM, de Andrade HM, Vainstein MH, Wanke B, Schrank A, Balaguez CB, et al. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. *Future Microbiol*. 2013;8(4):549-63. DOI: 10.2217/fmb.13.22.

62. Hamilton AJ, Figueroa JI, Jeavons L, Seaton RA. Recognition of cytoplasmic yeast antigens of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by immune human sera. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;17(2):111-9.
63. Saha DC, Xess I, Zeng WY, Goldman DL. Antibody responses to *Cryptococcus neoformans* in Indian patients with cryptococcosis. *Med Mycol*. 2008;46(5):457-63. DOI: 10.1080/13693780801961345.
64. Chai HC, Tay ST. Detection of IgM and IgG antibodies to *Cryptococcus neoformans* proteins in blood donors and HIV patients with active cryptococcosis. *Mycoses*. 2009;52(2):166-70. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01549.x.
65. Gressler AE, Volke D, Firacative C, Schnabel CL, Muller U, Krizsan A, et al. Identification of disease-associated cryptococcal proteins reactive with serum IgG from cryptococcal meningitis patients. *Front Immunol*. 2021;12:709695. DOI: 10.3389/fimmu.2021.709695.
66. Castañeda E, Lizarazo J, Firacative C. Criptococosis. In: González A, Gómez BL, Tobón A, Restrepo A, editors. *Fundamentos de las micosis humanas*. 1 ed: CIB - Universidad de Antioquia; 2018. p. 157-73.
67. WHO. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; 2018. 64 p.
68. Nosanchuk JD, Rosas AL, Casadevall A. The antibody response to fungal melanin in mice. *J Immunol*. 1998;160(12):6026-31.
69. De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M, et al. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood*. 2004;103(6):2180-6. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2375.
70. McGowan JP, Shah SS, Small CB, Klein RS, Schnipper SM, Chang CJ, et al. Relationship of serum immunoglobulin and IgG subclass levels to race, ethnicity and behavioral characteristics in HIV infection. *Med Sci Monit*. 2006;12(1):CR11-6.

71. Subramaniam K, French N, Pirofski LA. *Cryptococcus neoformans*-reactive and total immunoglobulin profiles of human immunodeficiency virus-infected and uninfected Ugandans. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(10):1168-76. DOI: 10.1128/CDLI.12.10.1168-1176.2005.
72. Bruner KT, Franco-Paredes C, Henao-Martinez AF, Steele GM, Chastain DB. *Cryptococcus gattii* complex infections in HIV-infected patients, Southeastern United States. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(11):1998-2002. DOI: 10.3201/eid2411.180787.
73. Chen SC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis.* 2012;55(6):789-98. DOI: 10.1093/cid/cis529.
74. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozi MT, Castaneda E, Latin American Cryptococcal Study G. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(7):e170554. DOI: 10.1590/0074-02760170554.
75. Fleuridor R, Lyles RH, Pirofski L. Quantitative and qualitative differences in the serum antibody profiles of human immunodeficiency virus-infected persons with and without *Cryptococcus neoformans* meningitis. *J Infect Dis.* 1999;180(5):1526-35. DOI: 10.1086/315102.
76. Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol.* 2015;78:76-86. DOI: 10.1016/j.fgb.2014.11.006.
77. Amrhein V, Greenland S, McShane B. Scientists rise up against statistical significance. *Nature.* 2019;567(7748):305-7. DOI: 10.1038/d41586-019-00857-9.
78. Di Leo G, Sardanelli F. Statistical significance: p value, 0.05 threshold, and applications to radiomics-reasons for a conservative approach. *Eur Radiol Exp.* 2020;4(1):18. DOI: 10.1186/s41747-020-0145-y.
79. Pitzurra L, Perito S, Baldelli F, Bistoni F, Vecchiarelli A. Humoral response against *Cryptococcus neoformans* mannoprotein antigens in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(1):91-6. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02181.x.
80. Casadevall A, Pirofski LA. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe.* 2012;11(5):447-56. DOI: 10.1016/j.chom.2012.04.004.

81. Laurenson IF, Lalloo DG, Naraqi S, Seaton RA, Trevett AJ, Matuka A, et al. *Cryptococcus neoformans* in Papua New Guinea: a common pathogen but an elusive source. *J Med Vet Mycol.* 1997;35(6):437-40.
82. Seaton RA, Hamilton AJ, Hay RJ, Warrell DA. Exposure to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*-a seroepidemiological study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(5):508-12.
83. Szymczak WA, Davis MJ, Lundy SK, Dufaud C, Olszewski M, Pirofski LA. X-linked immunodeficient mice exhibit enhanced susceptibility to *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio.* 2013;4(4). DOI: 10.1128/mBio.00265-13.
84. Diniz-Lima I, da Rosa PR, da Silva-Junior EB, Guimaraes-de-Oliveira JC, de Freitas EO, de Oliveira Nascimento D, et al. X-linked immunodeficient (XID) mice exhibit high susceptibility to *Cryptococcus gattii* infection. *Sci Rep.* 2021;11(1):18397. DOI: 10.1038/s41598-021-97041-9.
85. Feldmesser M, Mednick A, Casadevall A. Antibody-mediated protection in murine *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotrophic effects on cytokine and leukocyte responses. *Infect Immun.* 2002;70(3):1571-80. DOI: 10.1128/IAI.70.3.1571-1580.2002.

12. ANEXOS

Anexo 1. Manuscrito MIOC-2022-0145 sometido para publicación en la revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Carolina Firacative <cfiracative@gmail.com>

NEW SUBMISSION - Memórias - Manuscript ID MIOC-2022-0145

Memórias MIOC <onbehalfof@manuscriptcentral.com>
Antwort an: memorias@fiocruz.br
An: cfiracative@gmail.com
Cc: memorias.artigo@fiocruz.br

20. Juni 2022 um 17:07

20-Jun-2022

Dear Dr.(a) Firacative:

Your manuscript entitled "*Cryptococcus neoformans*- and *Cryptococcus gattii*-specific IgG, IgA and IgM differ among children and adults with and without cryptococcosis from Colombia" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2022-0145.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
memorias@fiocruz.br



Cryptococcus neoformans- and *Cryptococcus gattii*-specific IgG, IgA and IgM differ among children and adults with and without cryptococcosis from Colombia

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Articles
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Becerra-Álvarez, Paola; Universidad del Rosario, Studies in Translational Microbiology and Emerging Diseases (MICROS) Research Group, School of Medicine and Health Sciences Escandon, Patricia; Instituto Nacional de Salud, Group of Microbiology Lizarazo, Jairo; Hospital Erasmo Meoz, Internal Medicine Department, Universidad de Pamplona Quirós-Gómez, Óscar; Universidad CES, Group of Epidemiology and Biostatistics Firacative, Carolina; Universidad del Rosario, Studies in Translational Microbiology and Emerging Diseases (MICROS) Research Group, School of Medicine and Health Sciences
Keyword:	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cryptococcus gattii</i> , cryptococcal antigens, cryptococcosis, Colombia, immunoglobulins
Theme:	Infectious Disease, Microbiology, Immunology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

14 ABSTRACT

15 **Background.** *Cryptococcus neoformans* (*Cn*) and *Cryptococcus gattii* (*Cg*) cause
16 cryptococcosis, a life-threatening systemic mycosis of global distribution affecting mainly
17 immunocompromised adults. **Objectives.** To determine total and specific antibodies against
18 *C. neoformans* and *C. gattii* antigens in sera from patients with and without cryptococcosis
19 from Colombia. **Methods.** Using ELISA, total and *Cn*- and *Cg*-specific levels of
20 immunoglobulin (Ig)G, IgA and IgM were determined in sera from children and adults with
21 (n=109) and without (n=119) cryptococcosis from Colombia. **Findings.** Total IgG, IgA and
22 IgM levels were higher in HIV+ compared with HIV- patients with cryptococcosis.
23 Specific IgG, IgA and IgM levels tended to be higher in cryptococcosis patients than in
24 healthy controls and in adults than in children, with a positive correlation between antibody
25 reactivity and age. All immunoglobulins were more reactive against *Cn*-proteins than *Cg*-
26 proteins. A positive correlation between total and specific antibodies was found. **Main**
27 **conclusions.** In cryptococcosis patients from Colombia, serum immunoglobulins levels
28 differ depending on HIV status, as reported previously. Additionally, variations in
29 immunoglobulin production among adults and children with cryptococcosis and between
30 *Cn*- and *Cg*-protein antigens were established. Differential antibody reactivity with
31 cryptococcal proteins encourages further studies of the humoral immunity for host defense
32 against cryptococcosis.

34 KEYWORDS

35 *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; cryptococcal antigens; cryptococcosis;
36 Colombia; immunoglobulins; children; adults.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

37 **SPONSORSHIP**

38 This study was financed by a Return Fellowship from the Alexander von Humboldt
39 Foundation, Germany, to Carolina Firacative.

For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

40 INTRODUCTION

41 Cryptococcosis is a life-threatening infectious disease of global distribution caused by the
42 encapsulated yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes,
43 which affect mainly immunocompromised patients and, in less extent, immunocompetent
44 people or without evident predisposing factors [1]. Very closely after tuberculosis,
45 cryptococcosis is the second leading cause of death in patients infected with HIV [2]. In
46 Colombia, its annual incidence in the general population is 2.3 cases per million
47 inhabitants, while in people living with HIV the incidence increases to 1.1 cases per
48 thousand patients [3]. In addition, an average annual incidence of 0.017 cases per thousand
49 children under 16 years have been reported in Colombia [4]. Remarkably, the state of Norte
50 de Santander has the highest incidence of cryptococcosis in the general population in the
51 country (0.56 cases per 100,000 people) [3].
52 Cryptococcal infection is initiated by the inhalation of desiccated yeasts or basidiospores,
53 which are ubiquitous in the environment, mainly in soil, avian excreta, several species of
54 trees and decaying wood [5,6]. The infection presents initially as pneumonia, but after
55 dissemination to the central nervous system, it presents as meningitis, the most frequent
56 form, and meningoencephalitis, which can be fatal if it is left untreated [7]. In middle-
57 income countries, including Colombia, mortality from meningeal cryptococcosis is
58 estimated to range between 34 to 46% of the cases receiving amphotericin B plus
59 fluconazole as antifungal therapy, and up to 70% of the cases that do not receive
60 appropriate treatment [2,8].
61 As a consensus regarding the adoption of the new nomenclature for *C. neoformans* and
62 *C. gattii* has not yet been reached [9,10], to avoid confusion, in this study the cryptococcal

1
2
3
4
5 63 species are referred either as *C. neoformans* or as *C. gattii*. Even though more than 90% of
6
7 64 cases of cryptococcosis are caused by *C. neoformans*, *C. gattii* causes most cases in
8
9 65 individuals with an apparently normal immune system, as such, it has been long considered
10
11 66 a primary pathogen [1]. Increasing evidence, however, has shown that a significant
12
13 67 percentage of the patients affected by *C. gattii* have anti-granulocyte-macrophage colony-
14
15 68 stimulating factor autoantibodies, apart from other possible subtle alterations in their
16
17
18 69 immunity that facilitate infection by this species, which makes it therefore an opportunistic
19
20 70 pathogen [11-13]. Nevertheless, clinical data suggest that infections caused by *C. gattii* are
21
22 71 significantly more severe than those caused by *C. neoformans*, since *C. gattii* induces
23
24 72 massive inflammation and formation of cryptococcomas, which are associated with worse
25
26 73 neurological sequela and require additional clinical follow-up as well as longer periods and
27
28 74 higher doses of antifungal treatment [14]. The geographical distribution of these two
29
30 75 species also differs. While *C. neoformans* has a worldwide distribution, *C. gattii*
31
32 76 predominates in tropical and subtropical areas, with an on-going extension of its ecological
33
34 77 niche to temperate zones, especially to Vancouver Island in Canada and the Pacific
35
36 78 Northwest of the United States, where it has caused outbreaks of infection [1,15]. In
37
38 79 Colombia, about 4% of cryptococcosis cases have been reported to be caused by *C. gattii*,
39
40 80 with more than 90% of cases being from patients with no defined risk factors [16].
41
42 81 Although *C. neoformans* infection is known to be acquired at an early age, cryptococcosis
43
44 82 in children is very rare. In the literature, less than 500 cases of pediatric cryptococcosis
45
46 83 have been reported [4,17].
47
48 84 It is known that cryptococcal infection causes a strong and rapid humoral response with the
49
50 85 generation of antibodies [18,19], although the role of these antibodies has not been fully
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

86 understood and there are no clinical and serological studies that associate the presence and
87 class of antibodies with the persistence of the infection, relapse, reactivation and re-
88 infection. Several serological studies, however, have determined the reactivity and
89 established the prevalence of antibodies against the polysaccharide glucuronoxylomannan
90 (GXM) the major component of the cryptococcal capsule, in different patients and control
91 groups [20,21]. In contrast, fewer studies have explored the antibodies produced against
92 specific non-capsular protein antigens from both major cryptococcal species.
93 Immunoreactive proteins of *C. neoformans* and *C. gattii* that induce protective immune
94 responses in mice have been described [22-24]. In addition, disease-associated protein
95 antigens that have a role in the pathogenesis of cryptococcosis in rodents and koalas, have
96 been identified by immunoproteomics [18,25,26]. In humans, *C. neoformans* and *C. gattii*
97 protein antigens that react with immunoglobulin (Ig)G have also been recognized in diverse
98 populations, including adults with cryptococcosis, with and without HIV infection, as well
99 as in healthy children and adults [18,19,27,28]. Apart from IgG, *C. neoformans* specific
100 proteins that react with IgM and IgA [29-31] have been identified in cryptococcosis
101 patients and healthy people. More recently, by an immunoproteomic approach and
102 subsequent recombinant expression, disease-associated *C. neoformans* proteins reactive
103 with IgG antibodies were identified in serum pools from adult patients with and without
104 cryptococcosis from Colombia [32]. However, until now, the antibody levels to specific
105 protein antigens from both *C. neoformans* and *C. gattii*, in a large number of sera, including
106 sera from children with cryptococcosis, have not been reported.
107 This study aimed therefore to recognize the reactivity of proteins from the two main agents
108 of cryptococcosis that specifically react with IgG, IgM and IgA antibodies present in sera

1
2
3
4 109 from children and adults, with cryptococcosis and healthy, in Colombia. This investigation
5
6 110 allowed as well to determine that patients with cryptococcosis and healthy people present
7
8 111 surprisingly similar *C. neoformans*- and *C. gattii*-specific antibodies, which vary with the
9
10 112 age, presuming differential environmental exposure. The findings of this study are the basis
11
12 113 to identify IgA- and IgM-immunoreactive proteins that could play a role in cryptococcosis
13
14 114 defense.
15
16 115 Serum from healthy adults and children were recovered in 2019, from voluntary
17
18 116 participants in Bogota (68.9%), Norte de Santander (27.7%) and Boyaca (3.4%), after
19
20 117 signing an informed consent. The first two states were selected considering that they
21
22 118 represented the higher number of cryptococcosis cases included in the study and that,
23
24 119 historically, Norte de Santander has a notable high rate of cryptococcosis in the country [3].
25
26 120 Sera from healthy people were stored in the MICROS Group laboratory in Universidad del
27
28 121 Rosario, Bogota, Colombia. Age and sex of healthy individuals are detailed in Table 2.
29
30 122 For the purposes of this study, an adult was defined as anyone whose age was older than 19
31
32 123 years and a child as anyone between 0-19 years, following the definitions of the guidelines
33
34 124 on the diagnosis, prevention, and management of cryptococcosis in HIV-infected people
35
36 125 [34].
37
38
39
40
41
42
43
44

127 **MATERIALS AND METHODS**

128 **Sera collection**

129 Sera samples obtained from 109 patients with diagnosis of cryptococcosis and from 119
130 people with no apparent disease (healthy controls) were included in the study.
131 Cryptococcosis was diagnosed by blood culture and/or by detecting cryptococcal antigen

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

132 (CrAg) in sera, based on the CrAg latex agglutination system (CALAS®) (Meridian
133 Bioscience). *Cryptococcus* species were identified by phenotypic methods, including urease
134 activity and glycine assimilation on L-canavanine-glycine-bromothymol blue medium, as
135 described previously [33]. Sera from patients with cryptococcosis, belonging to the sera
136 collection of the Microbiology Group of the National Institute of Health in Bogota,
137 Colombia have been collected between 1999 and 2019, mostly from Bogota (56.9%) and
138 Norte de Santander (33.9%), but also from Huila (4.6%), Magdalena (1.8%), Bolivar,
139 Boyaca and Tolima (0.9% each). From the cases of cryptococcal infection, 81 (74.3%)
140 were caused by *C. neoformans* and 28 (25.7%) by *C. gattii*. The characteristics of these
141 patients, registered as part of the National Surveillance Program for *Cryptococcus* and
142 cryptococcosis in Colombia, led by the National Institute of Health, are summarized in
143 Tables 1 and 2. Infection with HIV was reported in 55 patients (50.5%), predominantly
144 affected by *C. neoformans* infection (98.2%). Most cases were from adult men (63.3%). In
145 the studied population, adults were 5.34 more likely to be diagnosed with cryptococcosis
146 than children (95% confidence interval (CI) 2.52 - 11.34, $p < 0.001$), and men were 9.92
147 times more likely to be diagnosed with cryptococcosis than women (95% CI 5.23 - 18.81, p
148 < 0.001). Because the number of cases of cryptococcosis in children is much lower
149 compared to the number of cases in adults [4], only 10 available sera samples from
150 children, all affected by *C. neoformans*, were included. From this group of patients, five
151 (50%) were HIV positive.

152

153 **Protein extraction from cryptococcal cells**

1
2
3
4 154 The reference strains of *C. neoformans*, H99, and of *C. gattii*, H0058-1-2029, which
5
6 155 represent the most common genotypes of these species causing disease in Colombia, VNI
7
8 156 and VGII, respectively [3] were used for the protein extraction. Total cryptococcal proteins
9
10 157 were extracted separately from both strains as previously reported [26,32], with some
11
12 158 modifications. Briefly, each strain was recovered from 10% glycerol stored at -80 °C by
13
14 159 plating it on Sabouraud dextrose agar for 48 hours at 27 °C. From each culture, a single
15
16 160 colony was transferred in Sabouraud dextrose broth and incubated with agitation at 80 rpm
17
18 161 and 30 °C for 48 h. Posteriorly, cells were harvested by centrifugation and washed twice
19
20 162 with 250 mM sucrose. About 5 g of centrifuged cells were then resuspended by pipetting in
21
22 163 5 ml of 2X lysis buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5 supplemented with 5 mM EDTA and 1X
23
24 164 protease inhibitor (Roche)) and 5 ml of a solution containing 8% 3-[(3-cholamidopropyl)
25
26 165 dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and 100 mM dithiothreitol (DTT). This
27
28 166 suspension was placed in a mortar, the cells were frozen with liquid nitrogen and
29
30 167 homogenized twice consecutively, by maceration with a pestle. To concentrate protein
31
32 168 samples and to remove contaminants, including salts, detergents, and carbohydrates,
33
34 169 proteins were recovered by centrifugation, after trichloroacetic acid (TCA) precipitation
35
36 170 and the concentration was measured with the NanoDrop™One/One (ThermoFisher
37
38 171 Scientific) using the Bradford method (ThermoFisher Scientific). Proteins samples were
39
40 172 kept frozen at -20 °C until further immunoglobulin isotyping.
41
42
43
44
45
46
47
48
49

174 **Total immunoglobulins quantification**

175 Total levels of IgG, IgA and IgM from all sera were quantified by ELISA, as previously
176 described [26,32]. Briefly, 96 well round bottom plates were coated with 50 µl of goat anti-

1
2
3
4 177 human-IgG, -IgA or -IgM, respectively (SouthernBiotech), diluted 1:1,000 in carbonate
5
6 178 buffer and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed once with phosphate
7
8 179 buffered saline (PBS) and 0.05% Tween-20 (PBST), blocked with blocking buffer (1X
9
10 180 PBS, 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% gelatin) for 1 h at room temperature and
11
12 181 washed twice with PBST. Human IgG (0.5 µg/ml), IgA (2 µg/ml) and IgM (2 µg/ml)
13
14 182 (SouthernBiotech) were used as standards, respectively. Sera were suspended in blocking
15
16 183 buffer containing 0.05% Tween-20, at a dilution of 1:100,000 for IgG and 1:2,000 for IgA
17
18 184 and IgM. Each diluted serum was placed in triplicate. The plates were incubated with the
19
20 185 standards and serum samples for 1.5 h at room temperature and washed three times with
21
22 186 PBST. Detection was done with goat anti-human IgG, IgA and IgM, respectively, labelled
23
24 187 with horseradish peroxidase (HRP) (SouthernBiotech) and diluted 1:4,000. After 2 h
25
26 188 incubation, the plates were washed four times with PBST and developed with 3,3',5,5'-
27
28 189 tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich). Immediately after the wells with the higher
29
30 190 concentration of the standard antibody reached an OD of 1.3 at 650 nm, developing of the
31
32 191 plates was stopped by adding 0.5 M H₂SO₄ (Sigma-Aldrich). A final reading of the plates
33
34 192 was done at 450 nm and the concentration of each immunoglobulin isotype per serum was
35
36 193 calculated using the software from the accuSkan FC microplate photometer (ThermoFisher
37
38 194 Scientific).

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 195

196 **Cryptococcal-specific immunoglobulins determination**

197 Specific IgG, IgA and IgM against *C. neoformans* and *C. gattii* total proteins were
198 determined, separately, for all serum samples as previously described [26], with various
199 modifications. Per well, ELISA plates were coated overnight with 0.5 µg of total proteins

1
2
3
4 200 of *C. neoformans* or *C. gattii*, respectively, and incubated overnight at 4 °C. The plates
5
6 201 were washed once with PBST and blocking was done with 5% skim milk dissolved in PBS
7
8 202 (SM). Sera were suspended in SM containing 0.05% Tween-20 (SMT), at a dilution of
9
10 203 1:100 for IgG and 1:25 for IgA and IgM. Each diluted serum was placed in duplicate in the
11
12 204 plate, due to the restricted volume of sera. Detection was done with HRP-goat-anti-human-
13
14 205 IgG, -IgA, or IgM, respectively (SouthernBiotech), diluted 1:4,000. Development of the
15
16 206 plates was done with TMB for 15 min at room temperature in the dark and stopped with 0.5
17
18 207 M H₂SO₄ prior to OD determination at 450 nm. The detection limit to determine specific
19
20 208 IgG, IgA and IgM against cryptococcal proteins was an OD <4.0. For all ELISA
21
22 209 experiments, wells incubated without sera samples but with all other reagents were used as
23
24 210 blanks. Titration of sera was not done due to the small volume of most samples.
25
26
27
28
29
30
31

32 **Statistical analysis**

33
34 213 Mean and standard deviation were calculated for quantitative variables, while relative
35
36 214 frequencies were calculated to describe qualitative variables. Mann-Whitney nonparametric
37
38 215 test for unpaired samples, 2-tailed Student test (t-Test) for unpaired data and 2-tailed
39
40 216 Fisher's exact test for categorical data were performed to determine statistical differences in
41
42 217 the total and specific levels of immunoglobulins between groups, according with the
43
44 218 ELISA results. A Wilcoxon signed-rank test was used to compared dependent variables.
45
46 219 The Pearson correlation coefficient (ρ) was used to assess the relationship between
47
48 220 continuous variables. Correlation was judged very strong from 1 to 0.8, strong from 0.8 to
49
50 221 0.5, fair from 0.5 to 0.2 and poor from 0.2 to 0. Normality of data was assessed with the
51
52 222 Shapiro-Wilk test. Alpha risk was set to 5% ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

223 with the online application EasyMedStat (version 3.9; www.easymedstat.com). GraphPad

224 Prism v 7.05 software was used to graph the results. Statistical significance is presented as

225 following: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

226

227 **ETHICS**

228 Patients' identification was anonymized for the purpose of this study, which was carried out

229 in accordance with the Technical Committee of Research (CTIN) and the Ethical

230 Committee for Research (CEIN) of the National Institute of Health, Bogota, Colombia,

231 protocol CEMIN N° 37-2017, as well as with the Research Ethics Committee of

232 Universidad del Rosario (CEI - UR), protocol DVO005 931-CV1073.

233

234 **RESULTS**

235 **Serum IgG levels increase during cryptococcosis while serum IgA and IgM levels are**

236 **higher in healthy individuals**

237 Production of total IgG was determined to be higher in patients with cryptococcosis than in

238 healthy controls, independently on HIV status and age. Among patients with cryptococcal

239 infection, serum IgG levels were higher in HIV-positive (HIV+) compared with HIV-

240 negative (HIV-) ($p = 0.0015$) (Figure 1A), as well as in adults compared to children,

241 although this difference was statistically non-significant ($p = 0.71$) and there was no

242 correlation between IgG levels and age ($p = 0.58$).

243 Contrary, serum IgA and IgM levels were generally higher in healthy controls than in all

244 patients with cryptococcosis, independently on the age. However, while the IgA levels were

1
2
3
4 245 lower during cryptococcal infection, independently on the HIV status (Figure 1B), IgM
5
6 246 levels were significantly lower in HIV- patients ($p < 0.0001$) but just slightly lower in
7
8 247 HIV+ patients, compared to healthy individuals ($p = 0.12$) (Figure 1C). Adults with
9
10 248 cryptococcosis presented statistically higher levels of both IgA and IgM than children with
11
12 249 cryptococcosis ($p = 0.0073$, $p = 0.03$, respectively), although there was no correlation
13
14 250 between the total level of these antibodies and age ($p = 0.98$, $p = 0.2$, respectively).
15
16 251 Patients infected with *C. neoformans* produced significantly more IgG ($p = 0.01$) and IgM
17
18 252 ($p = 0.009$) than those infected with *C. gattii*, as well as more IgA ($p = 0.33$), although the
19
20 253 difference was statistically non-significant. Total levels of IgG, IgA and IgM did not differ
21
22 254 among cryptococcosis patients nor among healthy controls coming from different
23
24 255 geographical regions (Bogota vs. Norte de Santander) ($p > 0.05$). Total antibody levels did
25
26 256 not differ either among men or women with or without cryptococcosis ($p > 0.05$).
27
28 257
29
30
31
32
33
34 258 **Cryptococcal-specific IgG, IgA and IgM are produced during cryptococcosis as well**
35
36 259 **as in healthy individuals, differing between adults and children**
37
38 260 After quantification of total immunoglobulin concentrations, specific IgG, IgA and IgM
39
40 261 that were reactive with total proteins of *C. neoformans* (*Cn*) and *C. gattii* (*Cg*), were
41
42 262 determined separately. Notoriously, the reactivity of IgG and IgM was significantly higher
43
44 263 with proteins from *C. neoformans* than from *C. gattii*, as established by the determined OD,
45
46 264 not only in sera from cryptococcosis patients but also in sera from healthy individuals
47
48 265 (Figure 2A). Although in patients with cryptococcosis the reactivity of IgA with *C.*
49
50 266 *neoformans* proteins was also significantly higher than the reactivity of this antibody with
51
52 267 *C. gattii* proteins, in healthy people IgA reacted significantly more with *C. gattii* than with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

268 *C. neoformans* proteins (Figure 2B). In both studied groups, cryptococcosis patients and
269 healthy controls, a strong positive linear correlation was found between *Cn*- and *Cg*-
270 specific IgG ($\rho = 0.6$ and $p < 0.0001$), *Cn*- and *Cg*-specific IgA ($\rho = 0.94$ and $p < 0.0001$),
271 as well as *Cn*- and *Cg*-specific IgM ($\rho = 0.92$ and $p < 0.0001$).

272 ODs for specific IgG against both *C. neoformans* and *C. gattii* proteins were higher in
273 adults than in children, with and without cryptococcosis (Figures 3A and 3B), although the
274 differences were not always statistically significant. In addition, a positive linear correlation
275 was found between specific IgG and age ($\rho \leq 0.22$ and $p \leq 0.05$). Similarly, ODs for
276 specific IgA (Figures 3C and 3D) and IgM (Figures 3E and 3F) against both *C. neoformans*
277 and *C. gattii* proteins tended to be higher in adults, compared to children, although none of
278 these differences had statistical significance. No or negligible correlation was found either
279 between specific IgA or specific IgM and age ($\rho \leq 0.1$ and $p > 0.05$) (Data not shown).

280 Independently of the cryptococcal species, the reactivity of specific IgG, IgA and IgM
281 antibodies did not differ among adults with cryptococcosis and healthy adults, nor among
282 children of both groups ($p > 0.05$). Only a slightly significant difference was found between
283 *Cn*-specific IgG in children (Figure 3A) and *Cn*-specific IgM in adults (Figure 3B).

284 In patients with cryptococcosis, specific IgG, IgA and IgM against *C. neoformans* and
285 *C. gattii* proteins did not differ with the HIV status and sex, nor with the species causing
286 the infection or the geographical region ($p > 0.05$).

287 In all sera from adults and children with or without cryptococcosis, a positive linear
288 correlation was found between total and specific levels of each antibody IgG, IgA and IgM,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

289 independently of the cryptococcal species from which the proteins were extracted.

290 However, statistical significance of the correlation differed among antibodies (Figure 4).

291

292 **DISCUSSION**

293 The role of humoral immunity in fighting against cryptococcosis remains uncertain.

294 However, several antibodies, predominantly IgG, which are reactive with GXM, melanin as

295 well as with diverse cryptococcal proteins, have been long identified, not only in patients

296 with cryptococcosis but also in hosts without clinical manifestations or without a history of

297 previous cryptococcal infection [20,21,35]. Our study supports these findings, as it shows

298 that not only serum IgG, but also IgA and IgM antibodies react with protein antigens of

299 both *C. neoformans* and *C. gattii*, and that these antibodies are present not only in sera from

300 adults with and without cryptococcal infection but also in sera from children with

301 cryptococcosis, whose cases are very uncommon to encounter, as well as in sera from

302 healthy children.

303 Similar to other studies, in the cohort from Colombia, cryptococcosis patients with HIV

304 presented significantly higher total IgG, IgA and IgM levels than those without HIV

305 infection, which could be related with the defects in cell mediated immunity and

306 hypergammaglobulinemia notable in HIV-infected people [36-38]. Notably, patients with

307 cryptococcosis caused by *C. neoformans* produced much higher levels of all antibodies,

308 compared with patients infected by *C. gattii*, which correlates with the proportion of HIV-

309 infected people affected by each species, which, in our study, represented 66.7% and 3.6%

310 of cases, respectively. Globally, cases of *C. gattii* infection affecting patients with HIV are

311 reported rarely, as it occurs in Colombia [8,14,39]. In addition, when analyzing patients

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

312 with cryptococcosis but without HIV, the levels of IgG, IgA and IgM did not differ among
313 patients affected with one or the other etiological agent.
314 While total IgG levels were much lower in our healthy patients, total IgA and IgM levels
315 seem to decrease significantly during cryptococcosis, independently on the HIV status,
316 which contrasts with other reports. The relationship between serum immunoglobulin levels
317 and HIV could however differ among studies, not only because of the methodology used to
318 measure antibody concentrations, but also because the immune response depends on the
319 clinical stage of the HIV infection of patients, which is unknown in our study, as well as on
320 the effect of cryptococcosis itself and the etiological agent causing the mycosis [31,40-42].
321 Reactivity of IgG, IgA and IgM antibodies against specific cryptococcal proteins, which
322 directly correlated with total levels of IgG, IgA and IgM, respectively, tended to be higher
323 in patients with cryptococcosis compared to healthy people. Although these differences
324 were not always statistically significant, they can be still real, true, and perhaps clinically
325 relevant [43,44]. Higher level of specific antibodies might be elicited by cryptococcal
326 proteins during infection, which has been reported by other investigators, not only in
327 murine but also in human cryptococcosis [18,22,23,31,45]. In the long run, the analysis of
328 the IgG, IgA and IgM responses to specific cryptococcal proteins could help identifying
329 immunodominant antigens that are protective, non-protective, or detrimental during
330 cryptococcosis. It is known that, depending on isotype, specificity and even host factors,
331 certain antibodies can alter the course of a fungal infection to the benefit or damage of the
332 host [41,46].
333 When comparing the reactivity of IgG, IgA and IgM with protein antigens from each of the
334 main etiological agents of cryptococcosis, we found that all serum immunoglobulins react

1
2
3
4 335 significantly more with *C. neoformans* proteins than with proteins of its sibling species,
5
6 336 *C. gattii*. Presuming environmental exposure, these findings agree with the fact that, not
7
8 337 only in Colombia, but also globally, *C. neoformans* prevail in ecological niches over
9
10 338 *C. gattii* [1,6,8]. In Australia and Papua New Guinea, where *C. gattii* infections are much
11
12 339 more common than those by *C. neoformans* [14,47], some sero-epidemiological differences,
13
14 340 depending on the etiological agent causing the infection, have been reported. Patients with
15
16 341 *C. gattii* cryptococcosis from Australia presented higher levels and a higher prevalence of
17
18 342 IgG and IgA against GXM than those with *C. neoformans* infection, possibly because
19
20 343 *C. gattii* is more immunogenic and the infection takes longer to be diagnosed [21].
21
22 344 However, opposite to our study, the study in Australia did not determine the prevalence of
23
24 345 antibodies against *C. gattii* specific proteins but only against polysaccharide antigens of
25
26 346 *C. neoformans*, which could generate biased results. In Papua New Guinea, adults with
27
28 347 *C. gattii* meningitis were reported to have higher IgG levels against non-capsular protein
29
30 348 antigens of the same species compared to children and healthy patients [48], which is
31
32 349 comparable with a noticeable finding in our study. In the Colombian cohort, serum
33
34 350 immunoglobulins, especially IgG, from adults with cryptococcosis and healthy, tended to
35
36 351 be more reactive with cryptococcal proteins than immunoglobulins from children with
37
38 352 cryptococcosis and healthy, respectively, with an observation that antibody reactivity
39
40 353 increases with age. Taken together, our findings strongly support the notion that, since
41
42 354 childhood, people are constantly immunized by chronic exposure of both cryptococcal
43
44 355 species, mainly *C. neoformans*. The finding of specific IgG, IgA and IgM against
45
46 356 cryptococcal proteins in sera from healthy people, as young as 1-year-old, allowed in
47
48 357 addition to estimate that in Colombia, children are exposed to the fungus at a very young
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

358 age, similarly to the reports from the Bronx in New York, where sera IgG from children
359 between 1.1 to 2 years old were the younger group that demonstrated reactivity to
360 *C. neoformans* proteins [19]. Considering that the number of sera from children analyzed in
361 our study is fairly low, which associates with the fact that pediatric cryptococcosis is
362 relatively rare, further studies including a higher number of serum samples from this age
363 group are recommended, in order to confirm our results and to draw more meaningful
364 conclusions. Lastly, although the prevalence of asymptomatic *C. neoformans* infection in
365 children has been reported to vary geographically, explained possibly by an association
366 with differences in environmental exposure to the yeast [27], in our study, no serological
367 differences between patients from Bogota and Norte de Santander were found, in spite of
368 the significant difference between the incidence of cryptococcosis in these two regions [3],
369 which then might be due to other factors such as host characteristics.
370 The general observations from our study, regarding the differential IgG, IgA and IgM
371 responses to protein antigens, from both *C. neoformans* and *C. gattii* in patients with
372 cryptococcosis and healthy people in different age groups might have important
373 implications for the prevention and therapy of cryptococcosis. For instance, further
374 proteomic studies can be done to identify reactive proteins that are disease-specific,
375 species-specific and/or age-specific, and that can be assessed for the development of
376 vaccines strategies not only for prevention of cryptococcosis but also aiming to control
377 reactivation, as environmental exposure to the yeasts occurs since childhood. As it has been
378 suggested that B cell response and antibodies are required in the normal clearance of
379 cryptococcal cells [49], it is possible that the specific IgG, IgA and IgM responses to
380 protein antigens may be of some significance, similarly to the production of antibodies

1
2
3
4 381 against the major capsular polysaccharide GXM, which has been correlated with improved
5
6 382 prognosis in both *C. neoformans* and *C. gattii* infections [50,51]. Differential antibody
7
8 383 reactivity with cryptococcal proteins could lead to a reappraisal of the study of humoral
9
10 384 immunity and its role for host defense against cryptococcosis.
11
12
13
14

15 385

16 386 **ACKNOWLEDGMENTS**

17
18 387 The authors thank Lorena Mora, from the School of Medicine and Health Sciences,
19
20 388 Universidad del Rosario, Bogota, Colombia and Karina Angarita, from the Faculty of
21
22 389 Medical Sciences and Health, Masira Institute, Universidad de Santander, Cucuta,
23
24 390 Colombia, for their help collecting serum samples.
25
26

27 391

28
29 392 **CONFLICTS OF INTEREST**

30
31 393 The authors declare no conflict of interest
32
33

34 394

35
36 395 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

37
38 396 Conceptualization, CF; methodology, PBA, PE and CF; formal analysis, PBA, OQG, and
39
40 397 CF; funding acquisition, CF; data curation, PBA and CF; writing original draft preparation,
41
42 398 PBA and CF; review and editing, PBA, PE, JL, OQG and CF. All authors have read and
43
44 399 agreed to the published version of the manuscript.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

400 **REFERENCES**

- 401 1. Kwon-Chung, K.J.; Fraser, J.A.; Doering, T.L.; Wang, Z.; Janbon, G.; Idnurm, A.;
402 Bahn, Y.S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of
403 cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, 4, a019760,
404 doi:10.1101/cshperspect.a019760.
- 405 2. Rajasingham, R.; Smith, R.M.; Park, B.J.; Jarvis, J.N.; Govender, N.P.; Chiller,
406 T.M.; Denning, D.W.; Loyse, A.; Boulware, D.R. Global burden of disease of HIV-
407 associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 2017, 17, 873-
408 881, doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
- 409 3. Escandón, P.; Lizarazo, J.; Agudelo, C.I.; Castañeda, E. Cryptococcosis in
410 Colombia: compilation and analysis of data from laboratory-based surveillance. *J Fungi*
411 (*Basel*) 2018, 4, doi:10.3390/jof4010032.
- 412 4. Lizarazo, J.; Escandón, P.; Agudelo, C.I.; Castañeda, E. Cryptococcosis in
413 Colombian children and literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014, 109, 797-804.
- 414 5. Velagapudi, R.; Hsueh, Y.P.; Geunes-Boyer, S.; Wright, J.R.; Heitman, J. Spores as
415 infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009, 77, 4345-4355,
416 doi:10.1128/IAI.00542-09.
- 417 6. Mitchell, T.G.; Castañeda, E.; Nielsen, K.; Wanke, B.; Lazéra, M.S. Environmental
418 Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In *Cryptococcus: From*
419 *Human Pathogen to Model Yeast*, Heitman, J., Kozel, T.R., Kwon-Chung, J.K., Perfect,
420 J.R., Casadevall, A., Eds. ASM Press: Washington, DC, 2011; pp. 237-259.
- 421 7. Maziarz, E.K.; Perfect, J.R. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2016, 30,
422 179-206, doi:10.1016/j.idc.2015.10.006.

- 1
2
3
4 423 8. Firacative, C.; Lizarazo, J.; Illnait-Zaragozi, M.T.; Castaneda, E.; Latin American
5
6 424 Cryptococcal Study, G. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo*
7
8 425 *Cruz* 2018, 113, e170554, doi:10.1590/0074-02760170554.
9
10
11 426 9. Hagen, F.; Khayhan, K.; Theelen, B.; Kolecka, A.; Polacheck, I.; Sionov, E.; Falk,
12
13 427 R.; Parmen, S.; Lumbsch, H.T.; Boekhout, T. Recognition of seven species in the
14
15 428 *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015,
16
17 429 78, 16-48, doi:10.1016/j.fgb.2015.02.009.
18
19
20 430 10. Kwon-Chung, K.J.; Bennett, J.E.; Wickes, B.L.; Meyer, W.; Cuomo, C.A.;
21
22 431 Wollenburg, K.R.; Bicanic, T.A.; Castaneda, E.; Chang, Y.C.; Chen, J., et al. The case for
23
24 432 adopting the "Species Complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis.
25
26 433 *mSphere* 2017, 2, doi:10.1128/mSphere.00357-16.
27
28
29 434 11. Rosen, L.B.; Freeman, A.F.; Yang, L.M.; Jutivorakool, K.; Olivier, K.N.;
30
31 435 Angkasekwina, N.; Suputtamongkol, Y.; Bennett, J.E.; Pyrgos, V.; Williamson, P.R., et al.
32
33 436 Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. *J Immunol* 2013,
34
35 437 190, 3959-3966, doi:10.4049/jimmunol.1202526.
36
37
38 438 12. Saijo, T.; Chen, J.; Chen, S.C.; Rosen, L.B.; Yi, J.; Sorrell, T.C.; Bennett, J.E.;
39
40 439 Holland, S.M.; Browne, S.K.; Kwon-Chung, K.J. Anti-granulocyte-macrophage colony-
41
42 440 stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by
43
44 441 *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. *mBio* 2014, 5, e00912-00914,
45
46 442 doi:10.1128/mBio.00912-14.
47
48
49 443 13. Yang, D.H.; England, M.R.; Salvator, H.; Anjum, S.; Park, Y.D.; Marr, K.A.; Chu,
50
51 444 L.A.; Govender, N.P.; Lockhart, S.R.; Desnos-Ollivier, M., et al. *Cryptococcus gattiiis*
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 445 species complex as an opportunistic pathogen: underlying medical conditions associated
446 with the infection. *mBio* 2021, 12, e0270821, doi:10.1128/mBio.02708-21.
- 447 14. Chen, S.C.; Slavin, M.A.; Heath, C.H.; Playford, E.G.; Byth, K.; Marriott, D.; Kidd,
448 S.E.; Bak, N.; Currie, B.; Hajkovicz, K., et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus*
449 *gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis* 2012, 55,
450 789-798, doi:10.1093/cid/cis529.
- 451 15. MacDougall, L.; Kidd, S.E.; Galanis, E.; Mak, S.; Leslie, M.J.; Cieslak, P.R.;
452 Kronstad, J.W.; Morshed, M.G.; Bartlett, K.H. Spread of *Cryptococcus gattii* in British
453 Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis* 2007,
454 13, 42-50, doi:10.3201/eid1301.060827.
- 455 16. Lizarazo, J.; Escandon, P.; Agudelo, C.I.; Firacative, C.; Meyer, W.; Castaneda, E.
456 Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii*
457 infections in Colombia from 1997-2011. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8, e3272,
458 doi:10.1371/journal.pntd.0003272.
- 459 17. Meiring, S.T.; Quan, V.C.; Cohen, C.; Dawood, H.; Karstaedt, A.S.; McCarthy,
460 K.M.; Whitelaw, A.C.; Govender, N.P.; Group for Enteric, R.; Meningeal disease
461 Surveillance in South, A. A comparison of cases of paediatric-onset and adult-onset
462 cryptococcosis detected through population-based surveillance, 2005-2007. *AIDS* 2012, 26,
463 2307-2314, doi:10.1097/QAD.0b013e3283570567.
- 464 18. Chen, L.C.; Goldman, D.L.; Doering, T.L.; Pirofski, L.; Casadevall, A. Antibody
465 response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. *Infect Immun* 1999,
466 67, 2218-2224.

- 1
2
3
4 467 19. Goldman, D.L.; Khine, H.; Abadi, J.; Lindenberg, D.J.; Pirofski, L.; Niang, R.;
5
6 468 Casadevall, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early
7
8 469 childhood. *Pediatrics* 2001, *107*, E66.
9
10
11 470 20. Abadi, J.; Pirofski, L. Antibodies reactive with the cryptococcal capsular
12
13 471 polysaccharide glucuronoxylomannan are present in sera from children with and without
14
15 472 human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1999, *180*, 915-919,
16
17 473 doi:10.1086/314953.
18
19
20 474 21. Speed, B.R.; Kaldor, J.; Cairns, B.; Pegorer, M. Serum antibody response to active
21
22 475 infection with *Cryptococcus neoformans* and its varieties in immunocompetent subjects. *J*
23
24 476 *Med Vet Mycol* 1996, *34*, 187-193.
25
26
27 477 22. Chaturvedi, A.K.; Weintraub, S.T.; Lopez-Ribot, J.L.; Wormley, F.L., Jr.
28
29 478 Identification and characterization of *Cryptococcus neoformans* protein fractions that
30
31 479 induce protective immune responses. *Proteomics* 2013, *13*, 3429-3441,
32
33 480 doi:10.1002/pmic.201300213.
34
35
36 481 23. Chaturvedi, A.K.; Hameed, R.S.; Wozniak, K.L.; Hole, C.R.; Leopold Wager,
37
38 482 C.M.; Weintraub, S.T.; Lopez-Ribot, J.L.; Wormley, F.L., Jr. Vaccine-mediated immune
39
40 483 responses to experimental pulmonary *Cryptococcus gattii* infection in mice. *PLoS One*
41
42 484 2014, *9*, e104316, doi:10.1371/journal.pone.0104316.
43
44
45 485 24. Young, M.; Macias, S.; Thomas, D.; Wormley, F.L., Jr. A proteomic-based
46
47 486 approach for the identification of immunodominant *Cryptococcus neoformans* proteins.
48
49 487 *Proteomics* 2009, *9*, 2578-2588, doi:10.1002/pmic.200800713.
50
51
52 488 25. Jobbins, S.E.; Hill, C.J.; D'Souza-Basseal, J.M.; Padula, M.P.; Herbert, B.R.;
53
54 489 Krockenberger, M.B. Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 490 cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. *J Proteome Res* 2010, 9, 3832-3841,
5
6 491 doi:10.1021/pr100028t.
7
8 492 26. Firacative, C.; Gressler, A.E.; Schubert, K.; Schulze, B.; Muller, U.; Brombacher,
9
10 493 F.; von Bergen, M.; Alber, G. Identification of T helper (Th)1- and Th2-associated antigens
11
12 494 of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. *Sci Rep* 2018, 8,
13
14 495 2681, doi:10.1038/s41598-018-21039-z.
15
16 496 27. Davis, J.; Zheng, W.Y.; Glatman-Freedman, A.; Ng, J.A.; Pagcatipunan, M.R.;
17
18 497 Lessin, H.; Casadevall, A.; Goldman, D.L. Serologic evidence for regional differences in
19
20 498 pediatric cryptococcal infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007, 26, 549-551,
21
22 499 doi:10.1097/INF.0b013e318047e073.
23
24 500 28. Martins, L.M.; de Andrade, H.M.; Vainstein, M.H.; Wanke, B.; Schrank, A.;
25
26 501 Balaguez, C.B.; dos Santos, P.R.; Santi, L.; Pires Sda, F.; da Silva, A.S., et al.
27
28 502 Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel
29
30 503 candidate antigens for diagnosis. *Future Microbiol* 2013, 8, 549-563,
31
32 504 doi:10.2217/fmb.13.22.
33
34 505 29. Chai, H.C.; Tay, S.T. Detection of IgM and IgG antibodies to *Cryptococcus*
35
36 506 *neoformans* proteins in blood donors and HIV patients with active cryptococcosis. *Mycoses*
37
38 507 2009, 52, 166-170, doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01549.x.
39
40 508 30. Hamilton, A.J.; Figueroa, J.I.; Jeavons, L.; Seaton, R.A. Recognition of cytoplasmic
41
42 509 yeast antigens of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans*
43
44 510 var. *gattii* by immune human sera. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997, 17, 111-119.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 511 31. Saha, D.C.; Xess, I.; Zeng, W.Y.; Goldman, D.L. Antibody responses to
5
6 512 *Cryptococcus neoformans* in Indian patients with cryptococcosis. *Med Mycol* 2008, 46,
7
8 513 457-463, doi:10.1080/13693780801961345.
9
10
11 514 32. Gressler, A.E.; Volke, D.; Firacative, C.; Schnabel, C.L.; Muller, U.; Krizsan, A.;
12
13 515 Schulze-Richter, B.; Brock, M.; Brombacher, F.; Escandon, P., et al. Identification of
14
15 516 disease-associated cryptococcal proteins reactive with serum IgG from cryptococcal
16
17 517 meningitis patients. *Front Immunol* 2021, 12, 709695, doi:10.3389/fimmu.2021.709695.
18
19
20 518 33. Castañeda, E.; Lizarazo, J.; Firacative, C. Criptococcosis. In *Fundamentos de las*
21
22 519 *micosis humanas*, 1 ed.; González, A., Gómez, B.L., Tobón, A., Restrepo, A., Eds. CIB -
23
24 520 Universidad de Antioquia: 2018; pp. 157-173.
25
26
27 521 34. WHO. *Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal*
28
29 522 *disease in HIV-infected adults, adolescents and children: Supplement to the 2016*
30
31 523 *consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV*
32
33 524 *infection*; Geneva, 2018; pp. 62.
34
35
36 525 35. Nosanchuk, J.D.; Rosas, A.L.; Casadevall, A. The antibody response to fungal
37
38 526 melanin in mice. *J Immunol* 1998, 160, 6026-6031.
39
40
41 527 36. Subramaniam, K.; French, N.; Pirofski, L.A. *Cryptococcus neoformans*-reactive and
42
43 528 total immunoglobulin profiles of human immunodeficiency virus-infected and uninfected
44
45 529 Ugandans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12, 1168-1176, doi:10.1128/CDLI.12.10.1168-
46
47 530 1176.2005.
48
49
50 531 37. McGowan, J.P.; Shah, S.S.; Small, C.B.; Klein, R.S.; Schnipper, S.M.; Chang, C.J.;
51
52 532 Rosenstreich, D.L. Relationship of serum immunoglobulin and IgG subclass levels to race,
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 533 ethnicity and behavioral characteristics in HIV infection. *Med Sci Monit* 2006, 12, CR11-
534 16.
- 535 38. De Milito, A.; Nilsson, A.; Titanji, K.; Thorstensson, R.; Reizenstein, E.; Narita,
536 M.; Grutzmeier, S.; Sonnerborg, A.; Chiodi, F. Mechanisms of hypergammaglobulinemia
537 and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 2004, 103,
538 2180-2186, doi:10.1182/blood-2003-07-2375.
- 539 39. Bruner, K.T.; Franco-Paredes, C.; Henao-Martinez, A.F.; Steele, G.M.; Chastain,
540 D.B. *Cryptococcus gattii* complex infections in HIV-infected patients, Southeastern United
541 States. *Emerg Infect Dis* 2018, 24, 1998-2002, doi:10.3201/eid2411.180787.
- 542 40. Fleuridor, R.; Lyles, R.H.; Pirofski, L. Quantitative and qualitative differences in
543 the serum antibody profiles of human immunodeficiency virus-infected persons with and
544 without *Cryptococcus neoformans* meningitis. *J Infect Dis* 1999, 180, 1526-1535,
545 doi:10.1086/315102.
- 546 41. Gibson, J.F.; Johnston, S.A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*
547 during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol* 2015, 78, 76-86, doi:10.1016/j.fgb.2014.11.006.
- 548 42. Subramaniam, K.; Metzger, B.; Hanau, L.H.; Guh, A.; Rucker, L.; Badri, S.;
549 Pirofski, L.A. IgM(+) memory B cell expression predicts HIV-associated cryptococcosis
550 status. *J Infect Dis* 2009, 200, 244-251, doi:10.1086/599318.
- 551 43. Amrhein, V.; Greenland, S.; McShane, B. Scientists rise up against statistical
552 significance. *Nature* 2019, 567, 305-307, doi:10.1038/d41586-019-00857-9.
- 553 44. Di Leo, G.; Sardanelli, F. Statistical significance: p value, 0.05 threshold, and
554 applications to radiomics-reasons for a conservative approach. *Eur Radiol Exp* 2020, 4, 18,
555 doi:10.1186/s41747-020-0145-y.

- 1
2
3
4 556 45. Pitzurra, L.; Perito, S.; Baldelli, F.; Bistoni, F.; Vecchiarelli, A. Humoral response
5
6 557 against *Cryptococcus neoformans* mannoprotein antigens in HIV-infected patients. *Clin*
7
8 558 *Exp Immunol* 2003, 133, 91-96, doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02181.x.
9
10
11 559 46. Casadevall, A.; Pirofski, L.A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and
12
13 560 therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe* 2012, 11, 447-456,
14
15 561 doi:10.1016/j.chom.2012.04.004.
16
17
18 562 47. Laurenson, I.F.; Laloo, D.G.; Naraqi, S.; Seaton, R.A.; Trevett, A.J.; Matuka, A.;
19
20 563 Kevau, I.H. *Cryptococcus neoformans* in Papua New Guinea: a common pathogen but an
21
22 564 elusive source. *J Med Vet Mycol* 1997, 35, 437-440.
23
24
25 565 48. Seaton, R.A.; Hamilton, A.J.; Hay, R.J.; Warrell, D.A. Exposure to *Cryptococcus*
26
27 566 *neoformans* var. *gattii*-a seroepidemiological study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, 90,
28
29 567 508-512.
30
31
32 568 49. Szymczak, W.A.; Davis, M.J.; Lundy, S.K.; Dufaud, C.; Olszewski, M.; Pirofski,
33
34 569 L.A. X-linked immunodeficient mice exhibit enhanced susceptibility to *Cryptococcus*
35
36 570 *neoformans* Infection. *mBio* 2013, 4, doi:10.1128/mBio.00265-13.
37
38
39 571 50. Feldmesser, M.; Mednick, A.; Casadevall, A. Antibody-mediated protection in
40
41 572 murine *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic effects on
42
43 573 cytokine and leukocyte responses. *Infect Immun* 2002, 70, 1571-1580,
44
45 574 doi:10.1128/IAI.70.3.1571-1580.2002.
46
47
48 575 51. Diniz-Lima, I.; da Rosa, P.R.; da Silva-Junior, E.B.; Guimaraes-de-Oliveira, J.C.;
49
50 576 de Freitas, E.O.; de Oliveira Nascimento, D.; Morrot, A.; Nimrichter, L.; Previato, J.O.;
51
52 577 Mendonca-Previato, L., et al. X-linked immunodeficient (XID) mice exhibit high
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

578 susceptibility to *Cryptococcus gattii* infection. *Sci Rep* 2021, *11*, 18397,
579 doi:10.1038/s41598-021-97041-9.
580
581

For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

582 **FIGURES**

583 **Figure 1. Total levels of serum IgG, IgA and IgM in cryptococcosis patients and**
584 **healthy controls.** Patients with cryptococcosis, both with HIV infection (HIV+) and
585 without HIV (HIV-), presented higher levels of total IgG compared to healthy controls (A).
586 Opposite, healthy individuals produced higher IgA (B) and IgM (C) levels compared to
587 cryptococcosis patients. Each spot represents a serum sample of an individual person. The
588 median value is shown by a horizontal line. Statistical significance, using the Mann-
589 Whitney nonparametric test for unpaired samples, is shown as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and
590 **** $p \leq 0.0001$.

591
592 **Figure 2. Reactivity of IgG, IgA and IgM with *Cryptococcus neoformans*- and**
593 ***Cryptococcus gattii*-proteins, in sera from patients with cryptococcosis and healthy**
594 **controls.** The reactivity of IgG, IgA and IgM with *C. neoformans* (Cn) and *C. gattii* (Cg)
595 proteins were measured and expressed as optical densities. In both studied groups,
596 cryptococcosis patients (A) and healthy individuals (B), Cn-specific IgG and Cn-specific
597 IgM were more reactive than Cg-specific IgG and Cg-specific IgM, respectively. While
598 serum IgA from patients with cryptococcosis were also more reactive with *C. neoformans*
599 proteins, serum IgA from healthy controls were more reactive with *C. gattii* proteins. The
600 median and range values are shown. Boxes extend from the first to the third quartile.
601 Statistical significance, using the Wilcoxon signed-rank test, is shown as ** $p \leq 0.01$, ***
602 $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

603

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

604 **Figure 3. Reactivity of IgG, IgA and IgM with *Cryptococcus neoformans*- and**
605 ***Cryptococcus gattii*-proteins in children and adults with and without cryptococcosis.**
606 The reactivity of IgG, IgA and IgM with *C. neoformans* (*Cn*) and *C. gattii* (*Cg*) proteins
607 were measured and expressed as optical densities. Generally, *C. neoformans* and *C. gattii*
608 proteins were less reactive with serum IgG (A and B), IgA (C and D) and IgM (E and F)
609 from children, with and without cryptococcosis, that with immunoglobulins from adults.
610 Independently of age and etiological agent, sera from healthy controls tend to be as reactive
611 with IgG, IgA and IgM as sera from patients with cryptococcosis. The median and range
612 values are shown. Boxes extend from the first to the third quartile. Statistical significance,
613 using the Mann-Whitney nonparametric test for unpaired samples, is shown as * $p \leq 0.05$,
614 ** $p \leq 0.01$, and **** $p \leq 0.0001$.
615
616 **Figure 4. Correlation between total and specific IgG, IgA and IgM in patients with**
617 **cryptococcosis and healthy controls.** Total serum levels of IgG (A and B), IgA (C and D)
618 and IgM (E and F) positively correlated with the reactivity of IgG, IgA and IgM with
619 *C. neoformans* (black dots) and *C. gattii* (grey dots) proteins, respectively, although the
620 correlation was not always statically significant. Each spot represents a serum sample of an
621 individual person. The correlation, denoted by r and represented by a line, shows the
622 amount of association between total and specific immunoglobulins. As the correlation is
623 positive, r is between 0 and 1. Statistical significance, using the Pearson product-moment
624 correlation coefficient, is shown as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

625 **TABLES**626 **Table 1.** HIV status, sex and etiological agent of patients with cryptococcosis.

		HIV status			Total
		HIV+	HIV-	No data	
Sex	Male	49	29	14	92
	Female	6	9	2	17
Etiological agent	<i>Cryptococcus neoformans</i>	54	15	12	81
	<i>Cryptococcus gattii</i>	1	23	4	28
Total		55	38	16	109

627

628 **Table 2.** Age and sex of patients with cryptococcosis and healthy controls.

Age and sex				
Population	Adults (M/F)	Children (M/F)	No data (M/F)	Total (M/F)
Cryptococcosis	79 (69/10)	10 (8/2)	20 (15/5)	109 (92/17)
Healthy controls	71 (25/46)	48 (17/31)	0	119 (42/77)
Total	150 (94/56)	58 (25/33)	20 (15/5)	228 (134/94)

629 M: male; F: female.

630

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

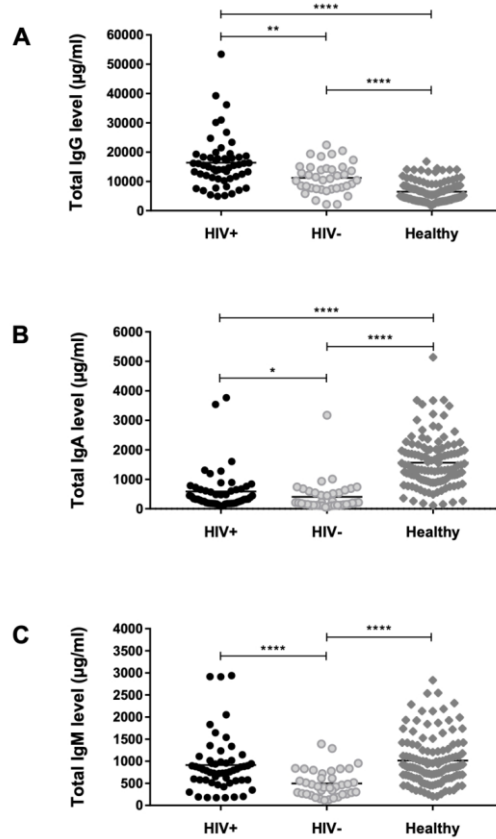


Figure 1. Total levels of serum IgG, IgA and IgM in cryptococcosis patients and healthy controls

481x755mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

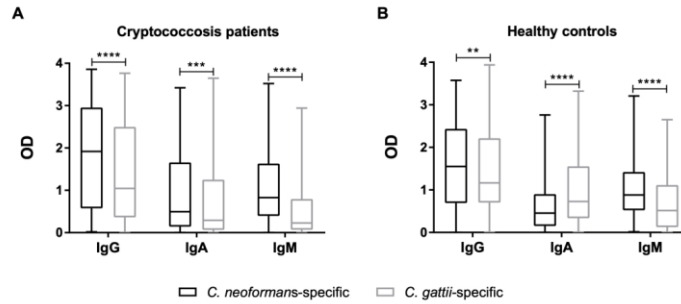


Figure 2. Reactivity of IgG, IgA and IgM with *Cryptococcus neoformans*- and *Cryptococcus gattii*-proteins, in sera from patients with cryptococcosis and healthy controls

949x407mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

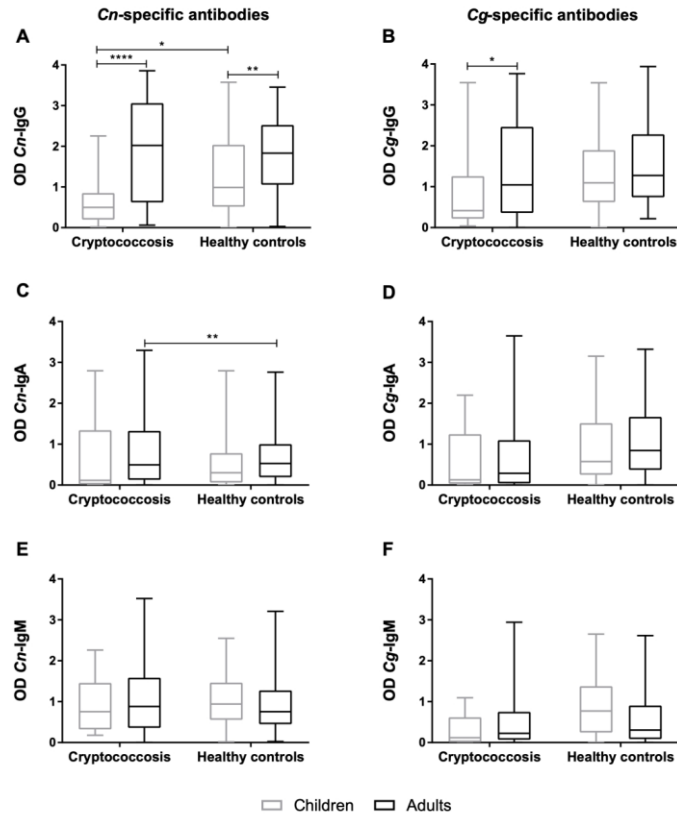


Figure 3. Reactivity of IgG, IgA and IgM with *Cryptococcus neoformans*- and *Cryptococcus gattii*-proteins in children and adults with and without cryptococcosis

818x914mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

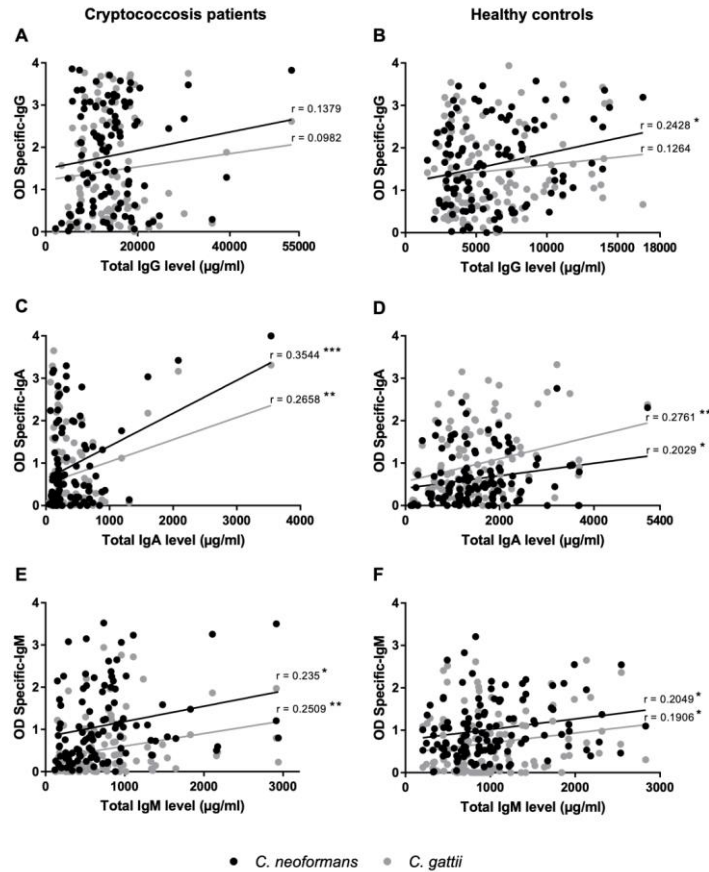


Figure 4. Correlation between total and specific IgG, IgA and IgM in patients with cryptococcosis and healthy controls

846x1006mm (72 x 72 DPI)

Anexo 2. Formato de consentimiento informado utilizado en el estudio

Formulario de consentimiento para la toma de sangre y recolección de sueros

Le estamos pidiendo que participe en un estudio de investigación científica.

Usted NO tiene que participar en el estudio.

Si dice que SI, puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento.

Por favor tome todo el tiempo que necesite para decidir y haga las preguntas que considere necesarias.

Título del estudio

Determinación de anticuerpos contra proteínas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis

Responsable del estudio

La persona responsable es la Dra. Carolina Firacative, profesora principal de carrera, Universidad del Rosario, Bogotá, a quien puede contactar antes, durante o después de la toma de la muestra de sangre al teléfono fijo en Bogotá 2970200 ext. 3404, al celular 310 5814835 o al correo electrónico sandra.firacative@urosaio.edu.co.

¿Para qué se firma este documento?

Lo firma para poder participar en el estudio.

¿Por qué se está haciendo este estudio de investigación?

Queremos saber más sobre cómo ayudar a las personas que tienen una infección llamada criptococosis, la cual está causada por un hongo llamado criptococo. Este hongo está presente o vive en el medio ambiente y desde niños estamos en contacto con él, pero afecta, es decir, causa enfermedad, especialmente a personas con el sistema inmunológico debilitado, por ejemplo con cáncer, SIDA y trasplantes de órganos. Esta infección puede generar problemas graves de salud. Este estudio nos ayudará a aprender más sobre la cantidad de personas que han estado en contacto con el hongo desde la niñez, y en general a aprender más sobre el hongo y sobre la enfermedad.

¿Qué pasa si digo “sí, quiero participar en el estudio”?

Si dice que sí:

- Le preguntaremos su edad, sobre su estado actual de salud, si toma alguna medicación, si sabe de alguna enfermedad que tenga actualmente.
- Le será tomada una muestra de sangre que será enviada a un laboratorio para su procesamiento. Esto será realizado por una persona capacitada para tal fin.
- Si quiere, podemos leerle las preguntas en voz alta y escribir sus respuestas en el formulario.

Estas preguntas no tienen respuestas correctas o incorrectas. Puede saltar cualquier pregunta si no quiere contestarla.

¿Cuánto tiempo tomará el estudio?

El estudio tomará alrededor de 30 minutos de su tiempo.

¿Qué pasa si digo “no quiero participar en el estudio”?

Nadie le tratará de manera diferente. A usted no se le penalizará. La atención que recibe no cambiará.

¿Qué pasa si digo que sí, pero cambio de opinión más tarde?

Usted puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento, incluso después de que su muestra de sangre haya sido llevada al laboratorio. A usted no se le penalizará. La atención que recibe no cambiará.

¿Quién verá mis respuestas?

Las únicas personas autorizadas para ver sus respuestas son las que trabajan en el estudio y las que se aseguran de que éste se realice de manera correcta y anonimizada, es decir, que su nombre no sea registrado en ninguna parte.

Sus respuestas a la encuesta y una copia firmada de este documento se mantendrán bajo llave en nuestros archivos. No incluiremos sus respuestas en ningún expediente médico.

Cuando compartamos los resultados del estudio, no incluiremos su nombre, ni datos personales. Haremos todo lo posible para que nadie fuera del estudio sepa que usted participó en él.

Su privacidad será protegida.

¿Qué pasa con mi muestra de sangre una vez finalice el estudio?

En el caso en que su muestra no se haya terminado al finalizar el estudio, usted nos puede autorizar para guardar el restante de muestra en una nevera de 4°C para ser utilizada en otros estudios. Si usted decide que su muestra sea usada SOLO en este estudio, su muestra será desechada según el protocolo del laboratorio responsable, una vez el estudio termine. Al final del documento usted podrá decidir si su muestra puede ser utilizada en estudios futuros o sólo en este estudio.

¿Me costará algo participar en el estudio?

No.

¿Me pagarán por mi tiempo?

No.

¿Qué pasa si se detectan anticuerpos contra criptococo en mi muestra de sangre?

Si usted tiene anticuerpos contra criptococo quiere decir que en algún momento de su vida ha estado en contacto con el hongo, ya que este vive en el ambiente. Sin embargo, no significa que esté enfermo ni que se vaya a enfermar. En el raro caso de que presente infección por criptococo, podrá acceder a un medicamento que evitará el desarrollo de la infección en su cuerpo y así evitará futuras complicaciones. Esto será formulado por un médico tratante durante una consulta médica.

¿Qué pasa si NO se detectan anticuerpos contra criptococo en mi muestra de sangre?

Si usted no tiene anticuerpos contra criptococo, no pasa nada.

Participar en este estudio, ¿podría ser malo para mí, de alguna manera?

Sí. Hay una muy baja posibilidad de que:

- Las preguntas le puedan hacer sentir triste o hacerle sentir mal.
- Tenga dolor en el momento de la punción para extraer la sangre, además puede presentar enrojecimiento y leve sangrado luego de la toma de muestra.

¿Qué debo hacer si tengo preguntas?

Por favor haga las preguntas que considere necesarias. Nosotros trataremos de contestar todas sus dudas. Por favor contáctenos en cualquier momento si:

- Tiene alguna pregunta sobre el estudio.
- Tiene preguntas sobre sus derechos.
- Cree que se ha lesionado de alguna manera por participar en este estudio.

¿Tengo que firmar este documento?

Si desea participar en el estudio, debe firmar el documento.

¿Qué debo hacer si quiero participar en el estudio?

Tiene que firmar este documento. Le entregaremos una copia.

Al firmar este documento está diciendo que:

- Está de acuerdo con participar en el estudio.
- Le hemos explicado y usted entiende la información que contiene este documento y hemos contestado todas sus preguntas.

Por favor tenga presente que:

- No tiene que contestar preguntas que no quiera contestar.
- En cualquier momento, puede dejar de contestar nuestras preguntas y no le pasará nada a usted.

¿Desea participar en el estudio, de tal manera que podamos tomarle una muestra de sangre?

Si ____ No ____

Su nombre

Su firma

Fecha

Edad _____

Género M__ F__

¿Nos autoriza para usar su muestra de sangre en estudios futuros?

Si ____ No ____

Su firma

Si se utilizó un intérprete:

Nombre del intérprete (en letra de molde)

Firma del intérprete

Fecha

Asentimiento informado

Si otra persona firma este formulario a nombre del participante, explique por qué:

Firma de la persona que provee el consentimiento en representación del sujeto

Fecha


Relación o parentesco: _____

Nombre de la persona que explica el consentimiento


Firma de la persona que explica el consentimiento

Fecha

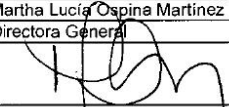
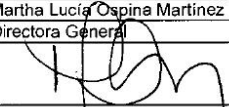
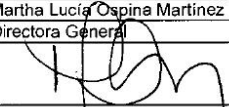
Anexo 3. Cartas de aprobación del CTIN y el CEIN del Instituto Nacional de Salud

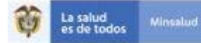
 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	AVAL TÉCNICO - ÉTICO PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	Versión: 01
		FOR-R03.0000-003	2012-Jun-19 Página 1 de 1

		Código CEMIN 37-2017
Título del Proyecto		
Determinación de anticuerpos contra proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis		
Ciudad y fecha	Bogotá D.C., 13/09/2017	
Dirigido a	Patricia Luz Escandón	
Grupo de investigación	Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica	
Correo electrónico de contacto investigador principal o referente en el INS	pescandon@ins.gov.co	
El Comité de Ética y de Metodologías de Investigación (CEMIN) del Instituto Nacional de Salud (INS), creado mediante Resolución 395 del 4 de abril de 2017, por la cual se reglamenta el Comité de Ética y Metodologías de Investigación; considera que el proyecto de investigación CEMIN N° 37-2017 "Determinación de anticuerpos contra proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis", reúne los requisitos técnicos y éticos para lo cual se concede aval según comunicado electrónico del 13 de septiembre de 2017.		
Nombre de quien ejerce las funciones	Yamileth Ortiz Gómez	
Cargo	Secretaria Ejecutiva CEMIN	
Firma		
Notas: 1. Este documento debe archivar en la carpeta del proyecto en el CEMIN 2. Debe informarse al CEMIN la fecha de inicio de ejecución del proyecto una vez esté asegurada la financiación del mismo, esta fecha contará como inicio para el seguimiento y solicitud de informes de avance y final 3. En caso de requerir modificación de aspectos éticos o técnicos del proyecto en su versión avalada, estos deben ser presentados al CEMIN para su debida autorización antes de la ejecución del proyecto.		
Firma de recibido del investigador principal o responsable en el INS Fecha de recibido: (dd/mm/aaaa)		

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO - INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	AVAL INSTITUCIONAL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FOR-R03.0000-006	Versión: 02
			2015 - 08 - XX
			Página 1 de 1

Código CEMIN	37-2017
--------------	---------

Título del Proyecto																			
Determinación de anticuerpos contra proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis																			
Ciudad y fecha	Bogotá D.C., 13/09/2017																		
Dirigido a	Patricia Luz Escandón Attn. Carolina Firacative (Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario)																		
Grupo	Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica																		
Entidad	Instituto Nacional de Salud																		
Correo electrónico del remitente	pescandon@ins.gov.co																		
Dirección de correspondencia del remitente	Instituto Nacional de Salud																		
Nombre del investigador responsable en el INS	Patricia Luz Escandón																		
<p>La presente con el fin de informar que el Instituto Nacional de Salud (INS) otorga aval institucional al proyecto de investigación titulado CEMIN N° 37-2017 "Determinación de anticuerpos contra proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis" para ser presentado a convocatoria en la Universidad del Rosario.</p> <p>Dicho proyecto tiene el aval técnico - ético del respectivo comité en el INS.</p> <p>Los siguientes son los rubros aprobados a ejecutar con recursos de contrapartida del INS:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Rubros INS</th> <th>Valor efectivo</th> <th>Valor especie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Recurso Humano</td> <td>-</td> <td>\$12.000.000</td> </tr> <tr> <td>Uso de equipos</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>-</td> <td>\$12.000.000</td> </tr> </tbody> </table> <p>El tiempo de ejecución del proyecto es de 24 meses</p> <p>* Contrapartidas sujetas a asignación presupuestal institucional</p> <table border="1"> <tr> <td>Nombre del Director General</td> <td>Martha Lucía Ospina Martínez</td> </tr> <tr> <td>Cargo</td> <td>Directora General</td> </tr> <tr> <td>Firma</td> <td></td> </tr> </table> <p>Nota: Este documento autoriza al investigador principal a iniciar la gestión del proyecto de investigación aprobado por el INS.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>Firma de recibido del investigador principal o responsable en el INS Fecha de recibido: (dd/mm/aaaa)</p> </div>		Rubros INS	Valor efectivo	Valor especie	Recurso Humano	-	\$12.000.000	Uso de equipos	-	-	Total	-	\$12.000.000	Nombre del Director General	Martha Lucía Ospina Martínez	Cargo	Directora General	Firma	
Rubros INS	Valor efectivo	Valor especie																	
Recurso Humano	-	\$12.000.000																	
Uso de equipos	-	-																	
Total	-	\$12.000.000																	
Nombre del Director General	Martha Lucía Ospina Martínez																		
Cargo	Directora General																		
Firma																			



MEMORANDO

BOGOTÁ D.C., 25 de Septiembre del 2019

No. 3-3000-19-02821

PARA: PATRICIA LUZ ESCANDON HERNANDEZ
Profesional especializado

DE: Despacho Subdirección Investigación

ASUNTO: CEMIN-37-2017

Buenas tardes

De acuerdo a su solicitud de autorización de uso de muestras biológicas de suero a la Universidad del Rosario planteado en el CEMIN-37-2017, cuyo título de proyecto es: "Determinación de anticuerpos contra proteínas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis". Al respecto el CEMIN menciona lo siguiente:

- El CEMIN aprueba el uso de transferencia de material biológico a la Universidad del Rosario que se realizará dentro del marco del proyecto titulado: "Determinación de anticuerpos contra proteínas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis".
- En cuanto a la reutilización de muestras biológicas recolectadas entre 1997-2016 y pertenecen a la vigilancia pasiva y la criptococosis en Colombia el CEMIN autoriza esta acción, dado que ya fue aprobado en el proyecto mencionado en la vigencia respectiva.

Cordialmente,

MARCELA MARIA MERCADO REYES

Subdirectora Técnica

Desea adjuntar documento: NO

Elaboró: SECRETARÍA EJECUTIVA CTIN

Avenida Calle 26 No. 51 - 20, Bogotá D.C., Colombia
Commutador (+57) 1 2207700 Ext: 1700-1704
Fax (+57) 1 2207700 Ext: 1283-1289
Correo electrónico: contactenos@ins.gov.co
Página web: www.ins.gov.co
Línea gratuita nacional: 018000-113 400



De la **medicina** tropical
a la **de la vida moderna**
encuentrocientifico.ins.gov.co

Anexo 4. Carta de aprobación del CEI, Universidad del Rosario

 Universidad del Rosario	COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DEL ROSARIO SALA DE CIENCIAS DE LA VIDA
MIEMBROS	<u>DVO005 931-CV1073</u>
CARLOS EMILIO TRUJILLO, PRESIDENTE MÉDICO CIRUJANO; MSc. EPIDEMIOLOGÍA	Bogotá D. C., 11 de octubre de 2019
JUAN GUILLERMO PÓRCEZ CARRERO MÉDICO BIOTECNISTA; SECRETARIO TÉCNICO	Doctora CAROLINA FIRACATIVE Investigadora Principal
RAMÓN FARRAD NAIFYAH LIC. EDUCACIÓN; PhD MATEMÁTICAS	Estudio: "Determinación de anticuerpos contra proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis". Bogotá D. C.
CARLOS ALBERTO CALDERÓN MÉDICO; MSc. FARMACOLOGÍA	Respetada investigadora:
CARLOS GUILLERMO CASTRO ABOGADO; ESP. DERECHO MÉDICO SANITARIO	El Comité de Ética en Investigación de la Universidad del Rosario (CEI-UR) evaluó de forma expedita la cuarta versión de su proyecto de investigación "Determinación de anticuerpos contra proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en sueros de niños y adultos colombianos sanos y con criptococosis". Fecha de recepción del proyecto: 30 de septiembre de 2019.
GLADYS VANESSA ESPINA FONDAUCIÓN; MSc y PhD EN CIENCIAS	Luego de haber tenido en cuenta las observaciones efectuadas por el CEI-UR, se APRUEBA el protocolo en referencia.
JANÉ CONSTANZA ROSAS BACTERIOLOGA; MSc. SALUD PÚBLICA; MSc. BIOTECNIA	Por favor tenga en cuenta las siguientes recomendaciones al momento de ejecutar el proyecto de investigación.
KATHERINE QUINTERO PARRA QUÍMICA FARMACÉUTICA	1. El proyecto plantea la transferencia y uso de muestras biológicas de otro proyecto de investigación relacionado con criptococosis ejecutado en el Instituto Nacional de Salud (INS).
LILIA FERNANDA RAMÍREZ PSICOLOGA- PhD PSICOLOGÍA SOCIAL Y DE LA SALUD	2. Se cuenta con el aval por parte del Comité de ética e investigación del INS para el uso y transferencia de muestras biológicas que se originaron en otro proyecto de investigación relacionado con la criptococosis.
MAGDA MELBA GAVIRIA BIÓLOGA; MSc EN BIOLÓGIA	3. La declaración de Tapie establece los lineamientos para investigación sobre las bases de datos, datos masivos y biobancos. En uno de sus puntos informa que: "el comité de ética debe aprobar también todo uso de información y material biológico y revisar si el consentimiento otorgado al momento de la recopilación es suficiente para el uso planificado o si se deben tomar otras medidas para proteger al donante.
MARTHA ROCÍO TORRES NAVARREZ FISIOTERAPEUTA; MSc BIOTECNIA	
ANDREA TORRES RUIZ INGENIERA BIOMÉDICA; MSc INS. ELECTRÓNICA Y DE COMPUTADORES	
CESAR FERRAN GÓMEZ MÉDICO; MSc GENÉTICA HUMANA; PhD CIENCIAS BÁSICAS	
JESÚS ORLANDO CROCI ABOGADO	
KAREN JULIETH MORENO FISIOTERAPEUTA; ESP. EPIDEMIOLOGÍA	
MARTHA ISABEL BAUTISTA DUEÑAS AUXILIAR ADMINISTRATIVA	
	
Carrera 24 N° 63C-69 Bogotá Teléfono: 2970200 Ext. 3295 E-mail: comite.etica@urosario.edu.co	<u>DVO005 931-CV1073</u> Página 1 de 2

MIEMBROS

CARLOS EMIGRE TRILLO, PRESIDENTE
MÉDICO ORLANO, MSc. EPIDEMIOLOGÍA

JUAN GUILLERMO PÉREZ CARRERO
MÉDICO BIODIVERSIDAD,
SECRETARIO TÉCNICO

RAMÓN FAYO NARFAY
LIC. EDUCACIÓN; PhD MATEMÁTICAS

CARLOS ALBERTO CALDERÓN
MÉDICO, MSc. FARMACOLOGÍA

CARLOS GUILLERMO CASTRO
ABOGADO, ESP. DERECHO MÉDICO-SANITARIO

GLEDY VARESA-ESPINA
FONOLÓGICA, MSc y PhD EN CIENCIAS

JAO CONSTANZA ROSA
BACTERIOLOGA, MSc. SALUD PÚBLICA;
MSc. BIOTICA

KATHERIN QUINTERO PARRA
QUÍMICA FARMACÉUTICA

LISA FERNANDA RAMÍREZ
PSICÓLOGA- PhD PSICOLOGÍA SOCIAL Y DE LA
SALUD

MAGDA MELBA GAVIÑA
BIÓLOGA, MSc EN BIOLÓGIA

MARTHA ROCIO TORRES NARVAEZ
FISIOTERAPEUTA, MSc BIOTICA

ANDREA TORRES RUIZ
INGENIERA BIOMÉDICA, MSc INE. ELECTRÓNICA Y
DE COMPUTADORES

CESAR PARRA GÓMEZ
MÉDICO, MSc GENÉTICA HUMANA; PhD
CIENCIAS BÁSICAS

JESÚS ORLANDO CROCI
ABOGADO

KAREN JULIETH MORENO
FISIOTERAPEUTA, ESP. EPIDEMIOLOGÍA

MARTHA ISABEL BAUTISTA DUBIAS
ALICERÍA ADMINISTRATIVA



4. Con el fin de proteger los derechos del donante de la muestra inicial, el uso de las muestras en la Universidad del Rosario debe limitarse solo a lo descrito en el presente proyecto y ser retornadas a INS una vez finalizado este.

Para el comité de ética es importante acompañarlo durante la ejecución del estudio. Por favor no dude en contactarnos en caso de tener alguna inquietud o de necesitar apoyo para el análisis de alguna situación específica. De igual forma le recomendamos notificar cualquier modificación en la ejecución del estudio no expuesta en la aprobación inicial del protocolo.

Cordialmente,


JUAN GUILLERMO PÉREZ MD, MSc
Secretario Técnico
(CEI-UN)



c.c. Archivo
Proyectó: Martha Isabel Bautista

Este comité se rige por los lineamientos jurídicos y éticos del país a través de las resoluciones 8430 de 1993 y 2378 de 2008 del Ministerio de Salud y Protección Social. Igualmente, se siguen los acuerdos contemplados en la declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil 2013) y de la Conferencia Internacional de Armonización para las Buenas Prácticas Clínicas. Recuerde visitar nuestra página web, en donde encontrará información actualizada de los procedimientos del Comité de Ética en Investigación de la Universidad del Rosario, así como cursos en ética de la investigación de acceso libre.

<https://www.urosario.edu.co/investigacion/soporte-a-la-investigacion/Comite-de-etica-en-investigacion/Id-cibc>