



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización de los fenotipos clínicos y la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos

María Hernández García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Caracterización de los fenotipos clínicos y la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos



María Hernández García

2024



**UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA**

SJD **Sant Joan de Déu**
Barcelona · Hospital



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Caracterización de los fenotipos clínicos y la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos

Memoria de tesis doctoral presentada por **María Hernández García** para optar
al grado de doctora por la Universidad de Barcelona.

Dirigida por **Iolanda Jordan Garcia**, médico adjunto de la Unidad de Cuidados
Intensivos Pediátricos del Hospital Sant Joan de Déu y catedrática de la
Universidad de Barcelona, y por **Laia Alsina Manrique de Lara**, jefa del servicio
de Alergología e Inmunología Clínica Pediátricas del Hospital Sant Joan de Déu
y profesora asociada de la Universidad de Barcelona.

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional.
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona.

Junio 2024

AGRADECIMIENTOS

Aquesta tesi no hagués estat possible sense la Ioli i la Laia, qui van confiar en mi en aquells primers mesos de pandèmia per embarcar-me en el projecte de recerca més interessant i alhora intens, que ens ha fet treballar a contrarellotge per donar resposta a la totes les preguntes que ens plantejava aquell nou virus, el SARS-CoV-2. Gràcies per tot, per la confiança, el recolzament, la paciència, i sobre tot per haver-me ensenyat tantes coses bones en aquests anys, per fer-me créixer tant a nivell professional com a nivell personal.

A la Gemma i la Maria, les meves companyes en aquesta aventura, “las rastreadoras”. Vosaltres sou la definició de tot lo bo que aporta treballar en equip. Gràcies per ser com sou, per compartir i per saber multiplicar les alegries i dividir les penes.

A tots els companys de la planta, desde la Mariona i el Juanjo fins les fellows més petites, és un plaer compartir el dia a dia amb vosaltres. Gràcies per tot l’aprenentatge i recolzament, em sento molt afortunada de formar part d’aquest gran equip.

A Javier, mi compañero de vida y quien confía más en mis capacidades que yo misma. Gracias por tu apoyo incondicional, tu empatía, tu amor infinito. Gracias por cuidarme siempre y acompañarme en este camino. A Max, mi hijo y lo mejor que me ha dado Javier, gracias por ser tan bueno y regalarme tu descanso para yo poder dedicar tiempo a esta tesis.

A mis padres, Miguel y Margarita, esta tesis es fruto de todo lo que representa vuestro amor y dedicación hacia mí. Vosotros me habéis enseñado que con constancia todo esfuerzo tiene su recompensa. Gracias por ser mi pilar y ayudarme a conseguir mis propósitos.

A mi hermana Laura, por estar siempre a mi lado y ser mi mayor confidente. A mis abuelos, tíos y primos, gracias por vuestro cariño y amor incondicional desde la distancia, por apoyarme siempre. A mis amigos, por dedicarme vuestro tiempo y por vuestra compañía. Sin todos vosotros este proyecto no habría sido posible.

FINANCIACIÓN

Algunos de los estudios que conforman estas tesis pudieron ser llevados a cabo gracias a la Plataforma Kids Corona, financiada por el Banco Santander, la Fundación Stavros Niarkos y otros donantes privados. Se trata de una plataforma que se creó en abril de 2020, con el objetivo de impulsar estudios de investigación que permitiesen averiguar cómo afectaba el SARS-CoV-2 a los niños y a las mujeres embarazadas, así como tratar de entender por qué la población infantil estaba más protegida frente a la COVID-19 en comparación a los adultos.



ÍNDICE

I. Índice de figuras.....	13
II. Índice de tablas.....	17
III. Abreviaturas y acrónimos.....	19
IV. Enumeración de los artículos de la tesis.....	23
1. Introducción.....	25
1.1. Origen y epidemiología del SARS-CoV-2.....	26
1.2. Virología.....	27
1.2.1. Taxonomía.....	27
1.2.2. Genoma y estructura viral.....	28
1.2.3. Variantes del SARS-CoV-2.....	31
1.3. Fisiopatología.....	32
1.3.1. Replicación viral.....	32
1.3.2. Daño tisular y respuesta inflamatoria secundaria.....	34
1.4. Manifestaciones clínicas en adultos.....	37
1.5. Manifestaciones clínicas en la edad pediátrica.....	42
1.5.1. Enfermedad aguda.....	43
1.5.1.1. Manifestaciones leves de manejo ambulatorio.....	43
1.5.1.2. Manifestaciones graves de manejo hospitalario.....	44
1.5.1.2.1. Enfermedad pulmonar.....	45
1.5.1.2.2. Manifestaciones extrapulmonares	47
1.5.2. Manifestaciones post-infecciosas: Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C) y Perniosis.....	48
1.5.3. Secuelas crónicas: COVID persistente.....	51
1.5.4. Impacto real en la hospitalización.....	51
1.6. Diferencias reportadas entre adultos y niños.....	52
1.7. Transmisión	53
1.7.1. Papel de los niños en la transmisión.....	57
1.8. Prevención.....	58
1.9. Diagnóstico.....	58
1.9.1. Pruebas de detección de ARN.....	60

1.9.2. Pruebas de detección de antígenos.....	61
1.9.3. Pruebas de detección de anticuerpos.....	61
1.9.4. Interpretación de las pruebas diagnósticas.....	63
1.9.5. Papel de la saliva como muestra diagnóstica.....	65
1.10. Tratamiento.....	65
2. Hipótesis.....	69
3. Objetivos.....	71
4. Material, métodos y resultados.....	73
4.1. Primer estudio.....	74
4.2. Segundo estudio.....	87
4.3. Tercer estudio.....	111
4.4. Cuarto estudio.....	123
4.5. Quinto estudio.....	147
5. Discusión.....	167
6. Conclusiones.....	191
7. Bibliografía.....	193

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Página 29: Organización del genoma de SARS-CoV-2.

Fuente: Ji-eun Lee, Jae Keun Chung, Tae sun Kim, Jungwook Park, Mi hyeon Lim, Da jeong Hwang, et al. Genomic and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 strains isolated in the city of Gwangju, South Korea. *bioRxiv*. 2020;12.16.423178.

Figura 2. Página 30: Proteínas estructurales de los coronavirus.

Fuente: Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2006;66:193-292.

Figura 3. Página 33: Ciclo de replicación del SARS-CoV-2.

Fuente: Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*. 2021 Jan 22;433(2):166725.

Figura 4. Página 36: Fisiopatología de la COVID-19.

Fuente: Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front Immunol*. 2023 Aug 14;14:1116131.

Figura 5. Página 38: Respuesta inmune y espectro clínico de la COVID-19.

Fuente: Meyerowitz EA, Scott J, Richterman A, Male V, Cevik M. Clinical course and management of COVID-19 in the era of widespread population immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2024 Feb;22(2):75-88.

Figura 6. Página 41: Manifestaciones extrapulmonares de la COVID-19.

Fuente: Ning Q, Wu D, Wang X, Xi D, Chen T, Chen G, et al. The mechanism underlying extrapulmonary complications of the coronavirus disease 2019 and its therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Feb 23;7(1):57.

Figura 7. Página 43: Espectro de gravedad de la COVID-19 en pacientes pediátricos.

Fuente: Howard-Jones AR, Burgner DP, Crawford NW, Goeman E, Gray PE, Hsu P, et al. COVID-19 in children. II: Pathogenesis, disease spectrum and management. J Paediatr Child Health. 2022 Jan;58(1):46-53.

Figura 8. Página 46: Distintos patrones radiográficos observados en pacientes pediátricos con neumonía por SARS-CoV-2: desde consolidaciones unilaterales a bilaterales, a un patrón intersticial e imágenes en vidrio deslustrado.

Fuente: Palabiyik F, Kokurcan SO, Hatipoglu N, Cebeci SO, Inci E. Imaging of COVID-19 pneumonia in children. Br J Radiol. 2020 Sep 1;93(1113):20200647.

Figura 9. Página 48: Manifestaciones extrapulmonares de la COVID-19 en pediatría.

Fuente: Pousa PA, Mendonça TSC, Oliveira EA, Simões-e-Silva AC. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 in children: a comprehensive review and pathophysiological considerations. J Pediatr (Rio J). 2021 Mar-Apr;97(2):116-139.

Figura 10. Página 49: Manifestaciones clínicas del síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C).

Fuente: Kundu A, Maji S, Kumar S, Bhattacharya S, Chakraborty P, Sarkar J. Clinical aspects and presumed etiology of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C): A review. Clin Epidemiol Glob Health. 2022 Mar-Apr;14:100966.

Figura 11. Página 59: Pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2: detección de ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), detección de antígenos mediante inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) y detección de anticuerpos mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Fuente: Shafie MH, Antony Dass M, Ahmad Shaberi HS, Zafarina Z. Screening and confirmation tests for SARS-CoV-2: benefits and drawbacks. Beni Suef Univ J Basic Appl Sci. 2023;12(1):6.

Figura 12. Página 63: Pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2, en qué momento es útil cada una.

Fuente: Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. Nat Rev Genet. 2021 Jul;22(7):415-426.

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Página 40: Clasificación de la COVID-19 según la gravedad de la enfermedad.

Fuente: National Institutes of Health. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. Updated: February 29, 2024 [Internet]. [consultado 13 Mar 2024]. Disponible en: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>

Tabla 2. Página 53: Vías de transmisión del SARS-CoV-2.

Fuente: Comité/Grupo de Pediatría Basada en la Evidencia de la AEP y AEPap. COVID-19 en Pediatría: valoración crítica de la evidencia [Internet]. 2022 Feb [consultado 7 Nov 2023]. Disponible en:

<https://www.aeped.es/comite-pediatria-basada-en-evidencia/documentos/covid-19-en-pediatria-valoracion-critica-evidencia>

Tabla 3. Página 54: Factores de riesgo de transmisión del SARS-CoV-2.

Fuente: Comité/Grupo de Pediatría Basada en la Evidencia de la AEP y AEPap. COVID-19 en Pediatría: valoración crítica de la evidencia [Internet]. 2022 Feb [consultado 7 Nov 2023]. Disponible en:

<https://www.aeped.es/comite-pediatria-basada-en-evidencia/documentos/covid-19-en-pediatria-valoracion-critica-evidencia>

Tabla 4. Página 55: Variables utilizadas para el estudio de la transmisión del SARS-CoV-2.

Fuente: Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias - Ministerio de Sanidad. Información científica-técnica sobre parámetros epidemiológicos [Internet]. Enero 2022 [consultado 8 Nov 2023]. Disponible en:

https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/20220113_EPIDEMIOLOGIA.pdf

Tabla 5. Pàgina 64: Definició de casos segùn la interpretació de las pruebas diagnòstiques.

Fuente: Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, Departament de Salut - Generalitat de Catalunya. Procediment d'actuació enfront de casos d'infecció pel nou coronavirus SARS-CoV-2 [Internet]. 2022. [consultado 14 Nov 2023]; Disponible en:

https://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspcat/vigilancia_salut_publica/COVID-19/protocols/procediment-actuacio-coronavirus.pdf

Tabla 6. Pàgina 66: Tratamiento de la COVID-19 en pacientes pediàtricos.

Fuente: Sociedad Española de Infectología Pediàtrica. Tratamiento del paciente pediàtrico con COVID-19 y síntomas respiratorios leves-moderados [Internet]. 2023 Sep [consultado 15 Nov 2023]. Disponible en:

<https://www.seipweb.es/wp-content/uploads/2023/09/Tratamiento-Cambios-COVID-leve-moderado-y-grave.-SEIP-v1.6.pdf>

III. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADM	Adrenomedulina
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AR	<i>Attack Rate</i> (Tasa de ataque)
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNss+	<i>Single-Stranded positive-sense RNA</i> (ARN monocatenario de polaridad positiva)
ARNss-	<i>Single-Stranded negative-sense RNA</i> (ARN monocatenario de polaridad negativa)
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i> (Péptido natriurético auricular)
CAR-T	<i>Chimeric Antigen Receptor T-Cell</i> (receptor de antígeno quimérico de células T)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades)
CoV	Coronavirus
COVID-19	COronaVIrus Disease 2019 (Enfermedad por Coronavirus 2019)
CRS	<i>Cytokine Release Syndrome</i> (Síndrome de liberación de citoquinas)
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Ciclo de umbral de positividad)
ECA2	Enzima Convertidora de Angiotensina 2
ECMO	<i>ExtraCorporeal Membrane Oxygenation</i> (Oxigenación por membrana extracorpórea)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea de Medicamentos)
ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i> (Retículo Endoplasmático)
ERGIC	<i>Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i> (Compartimento intermedio retículo endoplasmático-Golgi)
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
FCB	Futbol Club Barcelona

FiO ₂	Fracción inspirada de oxígeno
FR	Frecuencia Respiratoria
<i>gold standard</i>	Patrón de oro o Test de referencia
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comité Internacional de Taxonomía de los Virus)
IFN	Interferón
IgG/IgM/IgA	Inmunoglobulina de tipo G/M/A
IL	Interleuquina
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LFIA	<i>Lateral Flow ImmunoAssay</i> (Inmunoensayo de flujo lateral)
<i>long covid</i>	COVID-19 persistente
nsp	<i>Non-Structural Protein</i> (Proteína no-estructural)
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> (Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio)
MIS-C	<i>Multisystem Inflammatory Syndrome in Children</i> (Síndrome inflamatorio multisistémico en niños)
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (Institutos Nacionales de Salud)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco abierto de lectura)
PaO ₂	Presión parcial de Oxígeno Arterial
PCR	Proteína C Reactiva
PCT	Procalcitonina
PIMS	<i>Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome</i> (Síndrome multisistémico inflamatorio pediátrico)
PRISM	<i>Pediatric Risk of Mortality Score</i> (Escala de riesgo de mortalidad pediátrica)
qRT-PCR	<i>Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantificada en tiempo real)

RBD	<i>Receptor-Binding Domain</i> (Dominio de unión al receptor)
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (RNA polimerasa dependiente de RNA)
<i>Re</i>	Número reproductivo efectivo
RTC	<i>Replication/Transcription Complex</i> (Complejo replicasa transcriptasa)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)
<i>R0</i>	Número básico reproductivo
SAM	Síndrome de Activación Macrofágica
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> (Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave)
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> (Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2)
SDRA	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
sg mARNs	Subgenomas de ARN Mensajero
SIM-PedS	Síndrome Inflamatorio Multisistémico Pediátrico vinculado a SARS-CoV-2
SpO2	Saturación de Oxígeno en sangre por Pulsioximetría
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STSS	<i>Staphylococcal/Streptococcal Toxic Shock Syndrome</i> (Síndrome de shock tóxico estafilocócico o estreptocócico)
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TAS	Tasa de Ataque Secundario
TMPRSS2	<i>Transmembrane Protease Serine 2</i> (Serina proteasa transmembrana tipo II)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Factor de necrosis tumoral)
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VIS	<i>Vasoactive Inotropic Score</i> (Escala de vasoactivos inotrópicos)

VOC	<i>Variants Of Concern</i> (Variantes preocupantes)
VRS	Virus Respiratorio Sincitial
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular
2019-nCoV	2019 novel coronavirus

IV. ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS

Tesis en formato de compendio de publicaciones

La tesis consta de dos objetivos principales (y seis objetivos secundarios) y cinco artículos:

1. Solito C*, **Hernández-García M***, Arguedas Casamayor N, Pavón Ortiz A, Pino R, Alsina L, F. de Sevilla M. Ingresos COVID-19: intentando comprender el impacto real de la infección en pacientes hospitalizados. *Anales de Pediatría*. Marzo 2024. *Article in press*. doi: 10.1016/j.anpedi.2024.02.016.

** estos autores contribuyeron por igual y comparten la primera autoría.*

Factor de impacto 2023: 2,1 (Q3).

2. **Hernández-García M***, Solito C*, Pavón Ruiz A, Arguedas Casamayor N, Melé-Casas M, Pons-Tomàs G, F.de Sevilla M, Pino R, Launes C, Guitart C, Girona-Alarcón M, Jordan I, García-García JJ. Characteristics and Risk Factors Associated with SARS-CoV-2 Pneumonias in Hospitalized Pediatric Patients: A Pilot Study. *Children (Basel)*. 2023 Oct 19;10(10):1703. doi: 10.3390/children10101703. PMID: 37892366; PMCID: PMC10605629.

** estos autores contribuyeron por igual y comparten la primera autoría.*

Factor de impacto 2022: 2,4 (Q2).

3. **Hernández-García M**, Roldán-Berengué E, Guitart C, Girona-Alarcón M, Argüello G, Pino R, F de Sevilla M, García-García JJ, Jordan I. Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and sepsis differentiation by a clinical and analytical score: MISSEP score. *European Journal of Pediatrics*. 2023 Nov;182(11):5109-5118. doi: 10.1007/s00431-023-05168-w. PMID: 37676491; PMCID: PMC10640430.

Factor de impacto 2022: 3,6 (Q1).

4. **Hernández-García M**, Bassat Q, Fumado V, Rodas G, Pi R, Miranda-García M, Girona-Alarcón M, Català M, Alonso S, Álvarez-Lacalle E, López D, Melé-Casas M, Pons-Tomàs G, F de Sevilla M, Bonet-Carne E, Fortuny C, García-Miquel A, Jou C, Adroher C, Claverol J, Cubells M, Codina A, Cuadras D, Gratacós E, Brotons P, Muñoz-Almagro C, Prats C,

García-García JJ, Jordan I. SARS-CoV-2 transmission in teenagers and young adults in Fútbol Club Barcelona's Multidisciplinary Sports Training Academy. *European Journal of Pediatrics*. 2023 May;182(5):2421-2432. doi: 10.1007/s00431-023-04880-x. Epub 2023 Mar 14. PMID: 36914778; PMCID: PMC10010953.

Factor de impacto 2022: 3,6 (Q1).

5. Dobaño C, Alonso S, Vidal M, Jiménez A, Rubio R, Santano R, Barrios D, Pons Tomas G, Melé Casas M, **Hernández García M**, Girona-Alarcón M, Puyol L, Baro B, Millat-Martínez P, Ajanovic S, Balanza N, Arias S, Rodrigo Melero N, Carolis C, García-Miquel A, Bonet-Carné E, Claverol J, Cubells M, Fortuny C, Fumadó V, Codina A, Bassat Q, Muñoz-Almagro C, Fernández de Sevilla M, Gratacós E, Izquierdo L, García-García JJ, Aguilar R, Jordan I, Moncunill G. Multiplex Antibody Analysis of IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in Saliva and Serum from Infected Children and Their Close Contacts. *Frontiers in Immunology*. 2022 Jan 27;13:751705. doi: 10.3389/fimmu.2022.751705. PMID: 35154094; PMCID: PMC8828491.

Factor de impacto: 7,3 (Q1).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen y epidemiología del SARS-CoV-2

Los coronavirus (CoV) son virus con capacidad zoonótica, es decir, que pueden transmitirse desde los animales a los humanos. Los principales huéspedes animales infectados por coronavirus son las aves y los mamíferos. Los primeros coronavirus transmitidos a los humanos, los serotipos 229E y OC43, que fueron descritos en la década de 1960, son causa de síntomas clínicos leves, principalmente del tracto respiratorio superior y del tracto gastrointestinal. Desde entonces, se han aislado un total de seis coronavirus con capacidad infectiva hacia los humanos, aunque dos de ellos han sido causa de importantes brotes de patología respiratoria grave, e incluso fatal: el SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) y el MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) (1). El SARS-CoV se identificó en Guangdong (China) en noviembre de 2002 y fue el causante de más de 8000 infecciones y 774 muertes (9% de tasa de mortalidad) en 37 países durante los años 2002 y 2003 (2). El MERS-CoV se detectó inicialmente en Arabia Saudí en 2012, y desde entonces ha sido el responsable de más de 2600 infecciones y 945 muertes en 27 países, con una tasa de mortalidad del 36% (3).

A finales de diciembre de 2019 se aisló un séptimo coronavirus con capacidad para infectar a humanos, al que se denominó inicialmente 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). Las primeras personas infectadas presentaron síntomas compatibles con neumonía viral, algunos incluso desarrollando síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), y todas ellas estaban epidemiológicamente relacionadas con el mercado de animales de Huanan, en Wuhan (China) (4,5). Al poco tiempo se empezaron a observar casos de infección en trabajadores sanitarios, así como en familiares de personas infectadas, lo que confirmó la transmisión de la infección entre humanos (6). Tras la detección de varios brotes, inicialmente en China y posteriormente en otros países de Asia y del resto de continentes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró, el 30 de enero de 2020, la situación de “emergencia de salud pública de interés internacional”. Posteriormente, con el rápido aumento del número de infectados a pesar de las medidas de aislamiento, el 11 de marzo de 2020, la OMS calificó la situación como pandemia global (7). Desde entonces, el SARS-CoV-2 ha causado un importantísimo impacto a nivel mundial, haciendo que la comunidad científica trabaje a contrarreloj en la investigación del virus y poniendo a prueba a gobiernos y servicios sanitarios para poder

disponer de herramientas y pautas de actuación para contener su avance, a la vez que haciendo una gestión de los recursos lo más eficaz posible.

El 2019-nCoV se ha visto estrechamente relacionado con el SARS-CoV y el MERS-CoV, sobre todo con el primero, de ahí que posteriormente el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV) modificara su nombre a SARS-CoV-2 (8). A diferencia de éstos, el SARS-CoV-2 ha demostrado tener una tasa de mortalidad considerablemente más baja, del 0.9% en los últimos reportes, sin embargo, dado que se propaga mucho más rápidamente, ha causado ya muchas más muertes totales que ambos coronavirus anteriores combinados (9). A día de hoy, se han reportado más de 774 millones de casos y más de 7 millones de muertes a nivel mundial, aunque puede que estas cifras sean aún mayores ya que los casos informados no son una representación precisa de las tasas de infección debido a las reducciones en las pruebas y los informes a nivel mundial sobre todo desde mediados de 2022 (10). Se trata, por tanto, de la pandemia más importante que ha sufrido la humanidad en los últimos 100 años, sólo superada por la pandemia causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), activa desde su aislamiento en 1981.

1.2. Virología

1.2.1. Taxonomía

Los coronavirus, que pertenecen a la familia *Coronaviridae*, están divididos en cuatro grupos basados en su filogenia: alfa-CoV (grupo 1), beta-CoV (grupo 2), gamma-CoV (grupo 3) y delta-CoV (grupo 4). Los alfa-CoV y beta-CoV infectan a mamíferos, mientras que los gamma-CoV y delta-CoV infectan a aves. Dentro de los beta-CoV, se distinguen cuatro linajes: A, B, C y D. De los siete coronavirus conocidos con capacidad infectiva hacia los humanos, dos de ellos, NL63 y 229E, pertenecen al grupo de alfa-CoV; mientras que el resto, OC43, HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 pertenecen al grupo de beta-CoV (1).

Tanto SARS-CoV como MERS-CoV proceden de cepas de virus de murciélago (familia *Rhinolophidae*) y para poder infectar al ser humano necesitaron pasar previamente por un hospedador intermediario, siendo la civeta de las palmeras (*Paguma larvata*) en el caso del SARS-CoV y el dromedario (*Camelus dromedarius*) en el caso del MERS-CoV (1). En el caso de SARS-CoV-2, aunque su origen sigue siendo incierto, se postula que también procede de cepas

de virus de murciélago, dado que su genoma es hasta un 96.2% idéntico al coronavirus de murciélago RaTG13, y que su hospedador intermediario principal es el pangolín malayo (*Manis javanica*) (8,9,11).

Aunque SARS-CoV-2 pertenece a la misma familia y grupo que SARS-CoV y MERS-CoV, los análisis genómicos han revelado que existe una mayor similitud entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV (comparten hasta un 79.5% del genoma), de ahí que compartan nombre y pertenezcan al mismo linaje, el B (8,9,11,12). Además, se ha visto que SARS-CoV-2, al igual que SARS-CoV, reconoce al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) para entrar en la célula huésped. Se une a este receptor mediante un dominio de unión al receptor (RBD) específico, como comentaremos más adelante, que es muy similar entre SARS-CoV y SARS-CoV-2 (8,9,13,14).

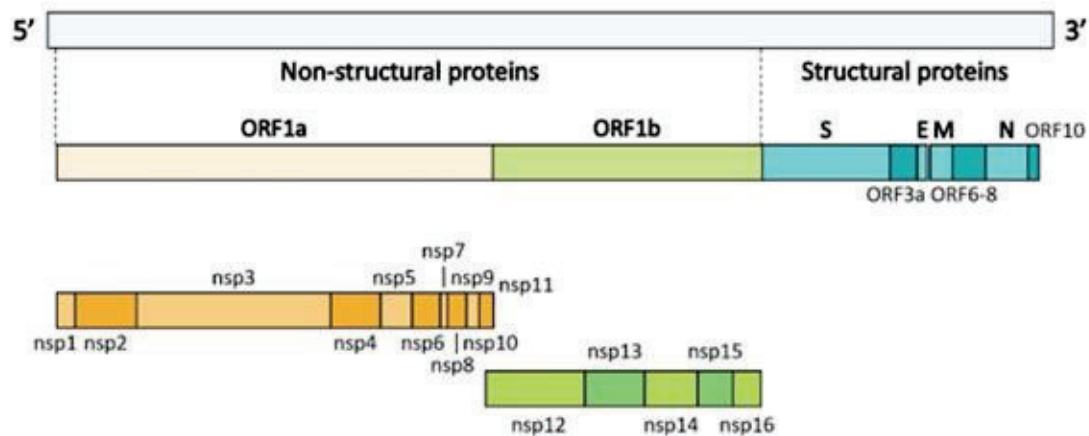
1.2.2. Genoma y estructura viral

Los coronavirus son virus con envuelta lipídica, formados por ARN de cadena simple y polaridad positiva, es decir, su secuencia sigue una orientación 5' → 3', lista para la traducción y posterior síntesis de proteínas. Con un genoma de 26-32 kilobases, son los virus con mayor tamaño de genoma de todos los virus de ARN conocidos, hecho que les confiere una mayor plasticidad a modificar su genoma mediante mutaciones y recombinaciones. El término coronavirus procede de la estructura de su membrana, la cual tiene unas proyecciones en forma de espículas que le da similitud a una corona (1,15,16).

Todos los coronavirus comparten características comunes en su organización y expresión de su genoma. Concretamente, el genoma de SARS-CoV-2 consta de 14 marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames*, ORF), que son fragmentos de ARN que son trasladados a proteínas (ver *Figura 1*). Los más importantes son ORF 1a y 1b, que conforman 2 tercios del genoma del virus, se encuentran en el extremo 5' y se trasladan a las poliproteínas pp1a y pp1ab, respectivamente. Estas poliproteínas son procesadas para producir 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16), que participan en la replicación, la traducción, la supresión de la respuesta inmune y la estabilización del ARN viral (1,12,17). Entre ellas, una proteína fundamental a destacar es la nsp12, también conocida como la RNA polimerasa dependiente de RNA o RdRp, principal implicada en la replicación y transcripción del genoma (14,18). La

alta tasa de mutación de los coronavirus es debida a su RdRp, que es propensa a errores durante la replicación de la información genética. Este hecho ha contribuido a que haya una gran diversidad de coronavirus en la naturaleza, infectando a numerosas especies (12,18).

Figura 1: Organización del genoma de SARS-CoV-2.



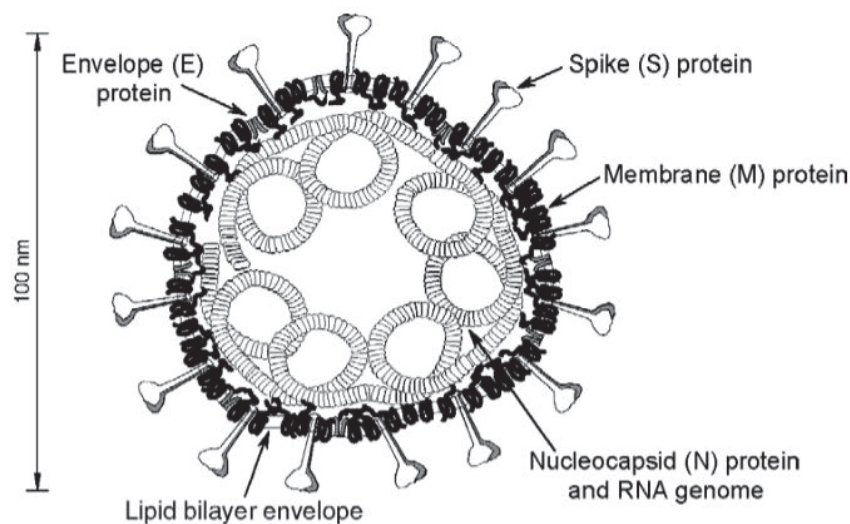
Fuente: Ji-eun Lee, Jae Keun Chung, Tae sun Kim, Jungwook Park, Mi hyeon Lim, Da jeong Hwang, et al. Genomic and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 strains isolated in the city of Gwangju, South Korea. bioRxiv. 2020;12.16.423178 (19).

El otro tercio restante del genoma de SARS-CoV-2 está formado por otros ORF en el extremo 3', que codifican para 4 proteínas estructurales (ver Figura 2): proteína “spike” (S), proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M) y proteína de nucleocápside (N); así como para otras proteínas accesorias (1,15).

La proteína S, también llamada proteína de espícula o “spike” en inglés, es una glicoproteína transmembrana de gran tamaño que forma las espículas características de los coronavirus. Esta glicoproteína posee dos subunidades funcionales: la subunidad 1 (S1), que se localiza periféricamente y su función es reconocer y unirse al receptor de la célula huésped mediante un dominio de unión al receptor (RBD); y la subunidad 2 (S2), de extensión transmembrana cuya función es llevar a cabo la fusión de membranas entre el virus y la célula huésped. El RBD del SARS-CoV-2 se une, como previamente hemos comentado, al receptor de la enzima

convertidora de angiotensina 2 (ECA2) (13–15,20). La ECA2, dentro del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), tiene como función principal degradar la angiotensina I en angiotensina 1-9 y la angiotensina II en angiotensina 1-7, adquiriendo de este modo propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias y antioxidantes. ECA2 se expresa en la mayoría de los tejidos del organismo, pero sobre todo se encuentra en la superficie de los neumocitos tipo I y tipo II, seguido de los enterocitos del intestino delgado, las células del túbulo proximal renal, las células miocárdicas y las células que conforman el músculo liso de los vasos sanguíneos. Estas localizaciones explican el principal tropismo tisular del virus hacia el pulmón, el intestino delgado, el riñón y el sistema cardiovascular (17,21).

Figura 2: Proteínas estructurales de los coronavirus.



Fuente: Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. Adv Virus Res. 2006;66:193-292 (15).

La proteína N es una proteína altamente inmunogénica que forma la nucleocápside y tiene como función facilitar la replicación viral dentro de las células huésped. Además, también se ha visto que se asocia junto a nsp3 (proteína no estructural 3) para participar en la transcripción y el empaquetado de la nucleocápside. La nucleocápside adopta una estructura helicoidal y está protegida por la envoltura, en la cual se insertan las proteínas virales S, E y M (14,15,20).

La proteína M es la proteína estructural predominante que está incrustada en la envoltura a través de varios dominios transmembrana. Su dominio exterior se ve involucrado en el tropismo de los órganos a infectar y en la capacidad de inducir interferón (IFN), una citoquina importante que ejerce efectos inmunomoduladores sobre células como macrófagos, linfocitos T y B y células NK. Además, esta proteína participa en la fijación de la nucleocápside a la membrana y es la responsable del transporte transmembrana de nutrientes, la formación de la envoltura y la liberación de la nueva partícula viral tras la replicación (20,22,23).

Por último, la proteína E, que es la más pequeña de las proteínas estructurales y la que se encuentra en menor cantidad en la envoltura del virus, no obstante, durante la etapa de replicación viral se expresa en cantidades considerables dentro de la célula infectada (21). Esta proteína participa sobre todo en la etapa de ensamblaje y liberación del virus (16,20,22).

1.2.3. Variantes del SARS-CoV-2

Al igual que otros virus de ARN, el SARS-CoV-2 evoluciona constantemente mediante mutaciones que potencialmente pueden conferirle un aumento o disminución de su infecciosidad y/o virulencia. A lo largo de la pandemia, la OMS ha asignado letras griegas a las distintas variantes del virus que han ido identificándose. Se han caracterizado múltiples variantes de interés, así como variantes preocupantes (*variants of concern*, VOC), que se definen como variantes que tienen unas características distintivas al resto, como por ejemplo una mayor transmisibilidad, una mayor virulencia, o una mayor capacidad para escapar a la acción del sistema inmune. Hasta la fecha, las principales VOC identificadas han sido: la variante Alfa (B.1.1.7), que se vio por primera vez en octubre de 2020 en el Reino Unido; la variante Beta (B.1.351), que se identificó originalmente en Sudáfrica en diciembre de 2020; la variante Gamma (P.1), que fue identificada en Brasil en enero de 2021; y la variante Delta (B.1.617.2), que fue identificada en India en octubre de 2020. Por último, la variante Ómicron (B.1.1.529), que fue designada como VOC en noviembre de 2021, identificándose por primera vez en Sudáfrica, y que desde entonces es, junto a sus subvariantes, la predominante en todo el mundo (24,25).

1.3. Fisiopatología

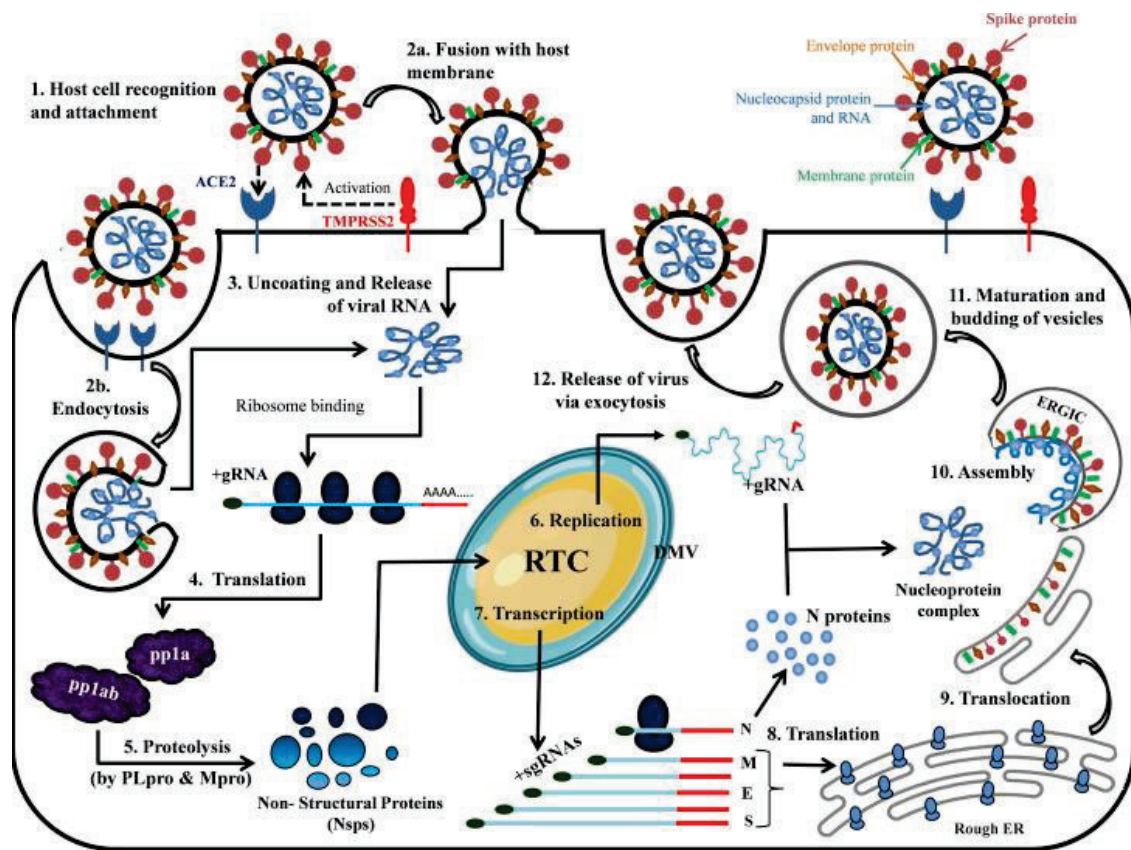
Desde el inicio de la pandemia la comunidad científica se ha volcado en el estudio de la enfermedad que produce el SARS-CoV-2, denominada por la OMS como COVID-19 (*CORonaVirus Disease* 2019). En la fisiopatología de la COVID-19 se definen fundamentalmente dos fases: en una primera fase ocurre la replicación viral causando un daño tisular directo, y en una segunda fase, que depende de la extensión de la primera y de la respuesta inmune del huésped, ocurre un reclutamiento de células efectoras inmunitarias que desencadenan una respuesta inflamatoria tanto local como sistémica, de mayor o menor intensidad, y que puede persistir incluso después de la eliminación viral (26,27).

1.3.1. Replicación viral

El SARS-CoV-2, a través de gotas respiratorias y aerosoles (*ver apartado 7. Transmisión*), accede al organismo por la boca, la nariz y las conjuntivas, y alcanza las células del epitelio respiratorio (células alveolares, neumocitos tipo I y tipo II), donde tendrá lugar el ciclo de replicación viral (*ver Figura 3*).

Inicialmente, se da el reconocimiento y la unión de la proteína S del virus al receptor ECA2 de la célula huésped del epitelio respiratorio. Este es un paso clave para que el virus pueda entrar en la célula, que lo hará o bien por endocitosis o bien por fusión de la envoltura viral con la membrana celular. A continuación, para conseguir que el material genético del virus pueda liberarse al citoplasma, la proteína S se debe escindir en sus dos subunidades: S1 y S2. Esta escisión está catalizada por una proteasa fundamental denominada TMPRSS2 (serina proteasa transmembrana tipo II). Una vez escindidas, la subunidad S1, mediante el dominio RBD, interactúa y se une con el receptor ECA2, y la subunidad S2 promueve la fusión de las dos bicapas lipídicas permitiendo así que la nucleocápside quede libre en el citoplasma celular (17,20,22,28).

Figura 3: Ciclo de replicación del SARS-CoV-2.



Fuente: Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol.* 2021 Jan 22;433(2):166725 (20).

Una vez completado el ingreso, la nucleocápside del virus se libera permitiendo la salida del ARN genómico viral. Esta secuencia de ARN empieza a ser traducida por los ribosomas de la célula huésped dando lugar a las dos poliproteínas que anteriormente mencionamos, la pp1a y la pp1ab, que posteriormente sufren un proceso de proteólisis para dar lugar a las 16 proteínas no estructurales del virus. Estas proteínas, junto con otros factores, son fundamentales para formar el complejo replicasa transcriptasa (RTC), el cual empieza la lectura de la hebra de ARN positiva propia del virus. Llegados a este punto se desencadena, por un lado, la replicación de más material genético y por otro, la transcripción de subgenomas de ARN mensajero (sg mARNs), es decir, fragmentos más pequeños de ARN que son codificados para la elaboración de las proteínas estructurales (20,22,28).

En la replicación, el ARN monocatenario de polaridad positiva (ARNss+) actúa de molde para sintetizar en primer lugar una copia de ARN monocatenario de polaridad negativa (ARNss-); algo similar es lo que realizan las pruebas de diagnóstico de detección de ARN como veremos más adelante. A continuación, el complejo RTC, gracias a su actividad enzimática replicativa, crea nuevamente una copia del genoma ARNss+ original del virus a partir del molde de ARNss. Estas hebras de ARN recién sintetizadas actuarán como genoma para la nueva progenie viral generada (20,22,28).

Mientras, en la transcripción se van elaborando las nuevas proteínas estructurales a partir de los sg mARNs. Por una parte, la proteína N se dirige hacia el ARN genómico viral recién sintetizado para formar la nucleocápside de los futuros viriones. Por otra parte, las proteínas estructurales S, M y E son procesadas en el retículo endoplasmático (ER) y posteriormente transportadas al aparato de Golgi (ERGIC), donde serán ensambladas junto con la nucleocápside y el ARN para formar nuevas partículas víricas. Estas últimas serán transportadas en forma de vesículas hacia la membrana plasmática celular, produciéndose así la liberación del virus por exocitosis y la muerte de la célula huésped. Los viriones liberados infectarán a otras células, dando así lugar a la progresión de la enfermedad (20,22,28).

1.3.2. Daño tisular y respuesta inflamatoria secundaria

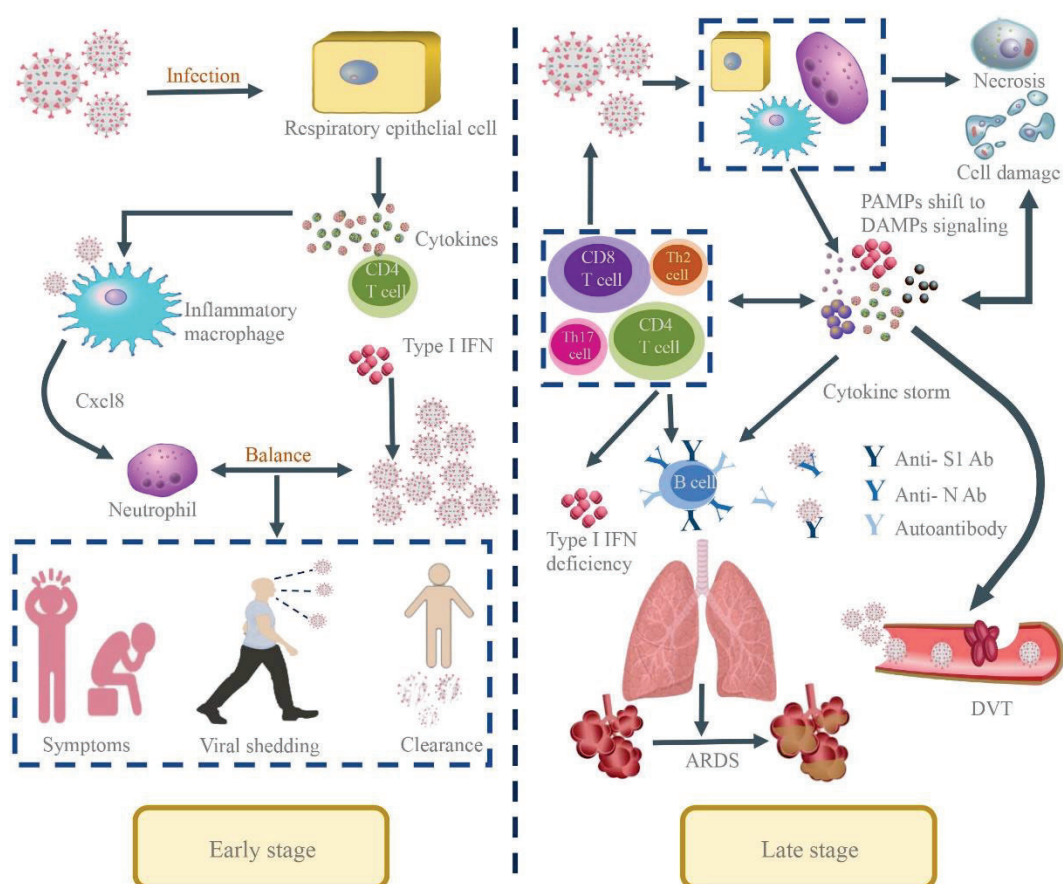
Así pues, una vez el SARS-CoV-2 entra en las células huésped e inicia la replicación, pueden ocurrir dos situaciones: 1) la que ocurre en la mayoría de las personas, que es un buen control de la infección gracias a unas respuestas inmune innata y adaptativa adecuadas que llegan a controlar el virus y bloquear la progresión inflamatoria, o bien 2) la que ocurre en un 15-20% de las personas aproximadamente, la COVID-19 grave, en la que acontece una desregulación de la respuesta inmune, con daño tisular y una respuesta inflamatoria masiva conocida como “tormenta de citoquinas”.

En la COVID-19 leve-moderada ocurre una respuesta antiviral inicial adecuada (producción de interferón de tipo I; IFN-I) que inhibe la replicación viral y la progresión de la enfermedad. Además, hay una activación de macrófagos y liberación de citoquinas de forma controlada, que permiten la activación de la respuesta inmune adaptativa (linfocitos T y B específicos

frente al virus, y producción de anticuerpos), lo que se traduce en una respuesta inflamatoria discreta y una rápida contención de la infección (26,29,30).

Sin embargo, en la COVID-19 grave, se genera inicialmente un daño tisular directo, es decir, toxicidad en los tejidos con alta expresión de ECA2 para los que el virus tiene tropismo. Esos tejidos, como hemos mencionado antes, son principalmente el pulmón, pero también el riñón, el aparato digestivo, el aparato cardiovascular, el sistema nervioso central, entre otros. Además, al bloquearse los receptores de ECA2, se desencadena una desregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, generándose un aumento de la permeabilidad vascular, vasoconstricción, inflamación y daño y remodelación tisular. Por otro lado, se produce un daño endotelial con consiguiente inflamación y generación de un ambiente protrombótico (por exceso de producción de trombina, inhibición de la fibrinólisis y activación del complemento), conduciendo al depósito de microtrombos y a la disfunción microvascular. Por último, se desencadena una desregulación de la respuesta inmune, con secuestro de linfocitos T, inhibición de la vía del IFN-I, e hiperactivación de algunos elementos de la inmunidad innata con reclutamiento y activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos. Estos a su vez, son los responsables de la liberación de citoquinas y quimiocinas (como IL-6, IL-1, TNF- α ...), generando la llamada tormenta de citoquinas o síndrome de liberación de citoquinas (CRS). El estado de inflamación generado por el CRS favorece la acumulación de radicales libres de oxígeno, la acumulación de ácido láctico, cambios en el pH intracelular, cambios electrolíticos y, en definitiva, agravamiento del edema y el daño tisular (26,31–33) (*ver Figura 4*).

Figura 4: Fisiopatología de la COVID-19.



Fuente: Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front Immunol.* 2023 Aug 14;14:1116131 (33).

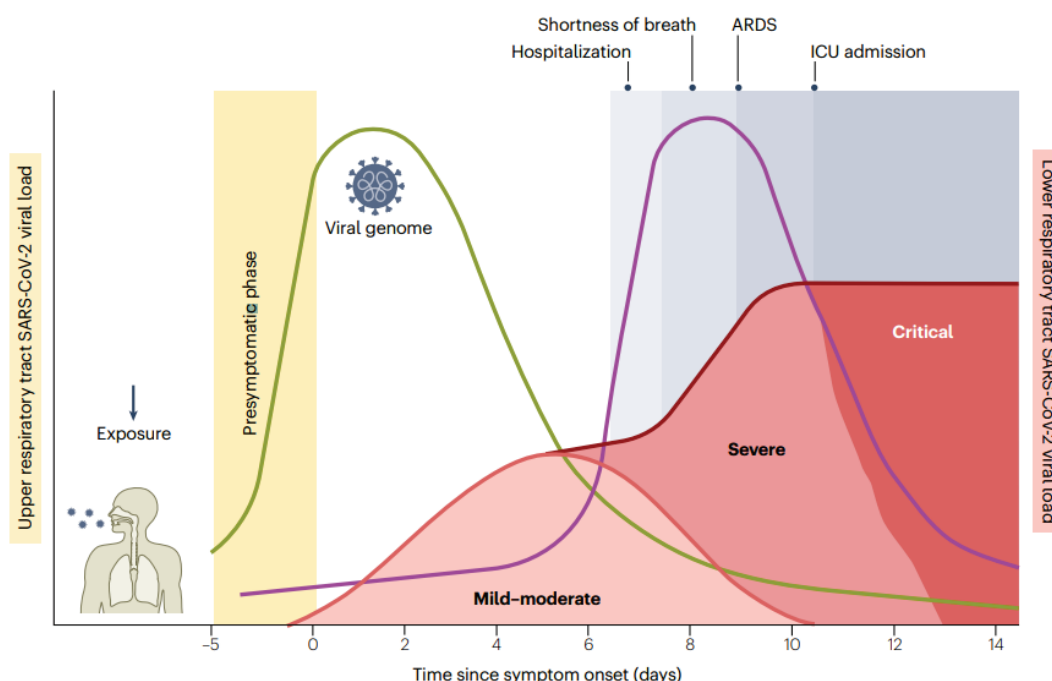
Por último, mirando específicamente a nivel pulmonar, el principal órgano afectado por la COVID-19, el CRS lleva a la relajación del músculo liso vascular, inflamación perivascular que conduce al depósito de microtrombos, al aumento de la permeabilidad vascular con el consiguiente edema pulmonar y a la formación de una membrana hialina, que conducen finalmente al desarrollo de un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (29,33,34). La complicación principal que produce el SDRA es la fibrosis pulmonar, que a su vez conduce a insuficiencia respiratoria, que es la primera causa de mortalidad secundaria a la COVID-19. Además, cuando el CRS no sólo se produce a nivel pulmonar, sino que se extiende de forma sistémica, puede conllevar el desarrollo de sepsis, coagulación intravascular diseminada, así como un fallo multiorgánico con alto riesgo de mortalidad (29,31–33).

1.4. Manifestaciones clínicas en adultos

Una vez se conoce la fisiopatología de la COVID-19, se puede entender mejor su expresión clínica. Tras la exposición inicial al SARS-CoV-2, los pacientes presentan un periodo de incubación de unos 5-7 días de mediana, en la llamada fase pre-sintomática, que puede diferir en duración según la variante del virus (35,36). Progresivamente el SARS-CoV-2 va replicando y aumentando su carga viral, que llega a su punto máximo aproximadamente en la primera semana tras la infección (*ver Figura 5*). A continuación, y en función de múltiples factores tales como la edad o la presencia de comorbilidades, los pacientes adultos desarrollarán una amplia gama de manifestaciones clínicas con distintos grados de gravedad: desde una enfermedad asintomática o leve en el 80% de los casos, hasta la presentación de neumonía, con posible desarrollo posterior de SDRA, shock séptico, fallo multiorgánico o muerte (30).

En términos generales, la COVID-19 afecta a personas con una edad media de 47 años, y ligeramente más a hombres (52%) que a mujeres (37). Como comentábamos, se ha demostrado que tanto la edad (mayores de 50 años) como la presencia de comorbilidades (sobre todo hipertensión, enfermedad cardiovascular, obesidad y diabetes) se relacionan con un peor pronóstico, con el desarrollo de una enfermedad más grave y mayor riesgo de hospitalización e ingreso en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). La mortalidad por esta enfermedad es muy variable, y oscila entre el 0.9% y el 3.5%, siendo superior en función de la edad y de las comorbilidades (38–40).

Figura 5: Respuesta inmune y espectro clínico de la COVID-19.



Fuente: Meyerowitz EA, Scott J, Richterman A, Male V, Cevik M. Clinical course and management of COVID-19 in the era of widespread population immunity. Nat Rev Microbiol. 2024 Feb;22(2):75-88 (41).

Por tanto, la mayoría de los pacientes adultos infectados presentarán una enfermedad asintomática o leve. En cuanto a las personas asintomáticas, múltiples estudios han intentado estimar su incidencia, ofreciendo datos muy dispares de entre el 1.6% y el 56.5%. Independientemente de la cifra, lo importante es que se ha demostrado que las personas asintomáticas tienen la misma infectividad que las que son sintomáticas, ya que se ha visto que tienen una carga viral similar. Por ello, identificar a estas personas es un factor clave para la prevención y el control de la COVID-19, como comentaremos más adelante (42).

Por otro lado, en cuanto a las personas que cursan la COVID-19 con síntomas, estos en general suelen ser leves e inespecíficos, como los de cualquier infección respiratoria de vías altas. Se ha visto que los tres síntomas más frecuentes son la fiebre (58%), la tos (54%) y la disnea (31%) (39,40,43). Otros síntomas descritos que aparecen en menor frecuencia son malestar (30%), astenia (28%) y esputo/mucosidad (25%). También pueden aparecer síntomas neurológicos (21%) – entre los que se incluyen las alteraciones del gusto y olfato como

anosmia y ageusia -, manifestaciones dermatológicas (20%), anorexia (20%), mialgias (17%), odinofagia (14%), cefalea (12%), dolor torácico (11%) y diarrea (10%) (43).

Sin embargo, en un 15% de las personas la infección progresará hacia una infección respiratoria de vías bajas, con la presentación de neumonía viral. Esto puede ocurrir a partir de los 8-9 días desde el inicio de la enfermedad (*ver Figura 5*). La neumonía se puede visualizar en una radiografía de tórax tanto de forma localizada como diseminada, aunque a diferencia de una neumonía bacteriana es más frecuente que se manifieste con afectación intersticial, con infiltrados periféricos, a nivel multilobar y bilateral (32,39,40).

Si el sistema inmune del paciente no contiene la progresión de la inflamación a nivel pulmonar, es cuando se desarrolla el SDRA, que ocurre en aproximadamente un 5% de los pacientes. El SDRA se define como una inflamación pulmonar grave que se manifiesta como un fallo respiratorio agudo, con hipoxemia, opacidades alveolares bilaterales con infiltrados que ocupan más del 50% del volumen pulmonar total y una disminución de la distensibilidad pulmonar que puede conducir a fibrosis pulmonar (27,32).

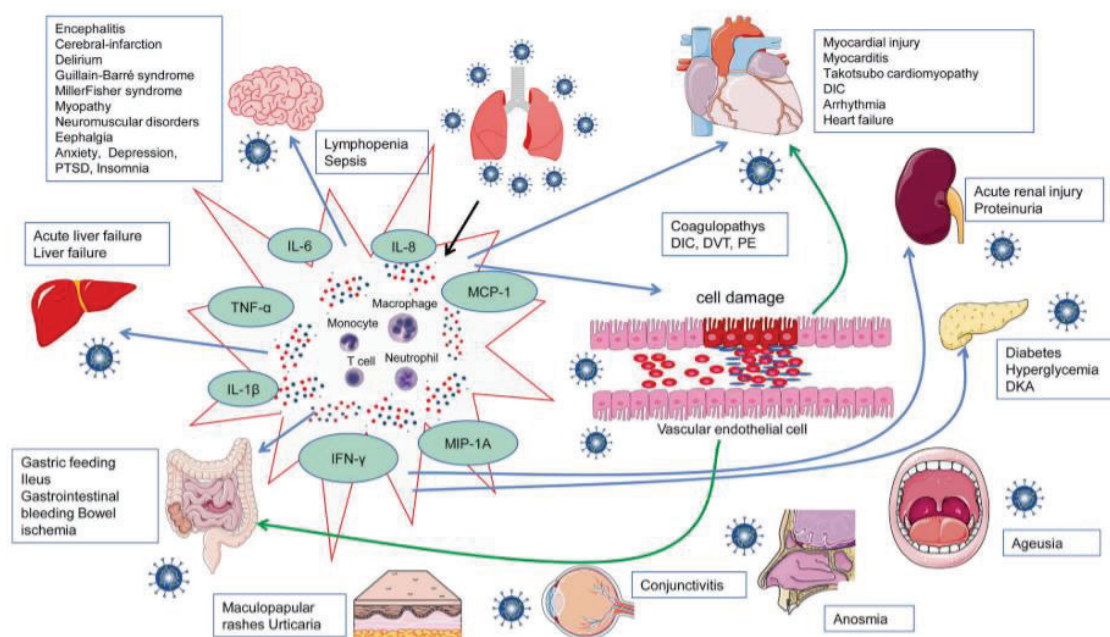
Teniendo en cuenta tanto los síntomas, como otros datos clínicos y radiográficos, se pueden distinguir varios grados de gravedad de la COVID-19. Por ello, los *National Institutes of Health (NIH)* de Estados Unidos, diseñaron una clasificación de la enfermedad en 5 grados de gravedad, que ha sido ampliamente usada (24). Se expone a continuación (*ver Tabla 1*):

Tabla 1. Clasificación de la COVID-19 según la gravedad de la enfermedad.	
Infección asintomática o pre-sintomática	Positividad en una prueba para SARS-CoV-2, sin la presencia de síntomas ni alteraciones en la radiografía de tórax
Enfermedad leve	Síntomas leves como fiebre o tos, pero sin asociar disnea ni alteraciones en la radiografía de tórax
Enfermedad moderada	Presencia de sintomatología o evidencia en la radiografía de tórax de afectación del tracto respiratorio inferior, pero con saturación de oxígeno (SpO ₂) ≥ 94% a aire ambiente
Enfermedad grave	Saturación de oxígeno (SpO ₂) < 94% a aire ambiente, una ratio de presión parcial de oxígeno arterial entre fracción inspirada de oxígeno (PaO ₂ /FiO ₂) < 300, taquipnea marcada con frecuencia respiratoria (FR) > 30 respiraciones por minuto, o infiltrados que ocupen más del 50% del volumen pulmonar total en la radiografía de tórax
Enfermedad crítica	Insuficiencia respiratoria aguda, shock séptico y/o fallo multiorgánico

Fuente: “Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines”. National Institutes of Health (NIH). Última actualización 29 febrero 2024 (24).

Por último, es importante conocer que la COVID-19 puede presentarse con otras múltiples manifestaciones extrapulmonares (ver Figura 6), ya que se puede desarrollar enfermedad en todos aquellos órganos con expresión del receptor de ECA2. La afectación renal es la más frecuente de todas las manifestaciones extrapulmonares, aunque también se pueden encontrar manifestaciones a nivel cardiovascular, hematológicas, gastrointestinales, hepáticas, neurológicas, endocrinas, dermatológicas y oculares (31,39,44).

Figura 6: Manifestaciones extrapulmonares de la COVID-19.



Fuente: Ning Q, Wu D, Wang X, Xi D, Chen T, Chen G, et al. The mechanism underlying extrapulmonary complications of the coronavirus disease 2019 and its therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Feb 23;7(1):57 (45).

Con este amplio espectro clínico de la COVID-19 en adultos, las distintas sociedades científicas han considerado que la evaluación de los pacientes debe incluir una prueba de imagen torácica (radiografía de tórax, ecografía o TAC pulmonar), así como un electrocardiograma. Además, en casos moderados o graves, se recomienda realizar analíticas sanguíneas con hemograma, estudio de coagulación, gasometría y un perfil bioquímico completo que incluya función renal y hepática y marcadores inflamatorios (24,46). En estos estudios de laboratorio se pueden encontrar marcadores de gravedad de la COVID-19 tales como: anemia, plaquetopenia, leucocitosis, neutrofilia, linfopenia, elevación del tiempo de protrombina y el dímero-D, elevación de enzimas cardíacas, hepáticas y alteración de la función renal, así como elevación de reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, procalcitonina, IL-6, ferritina o LDH) (27,40,46).

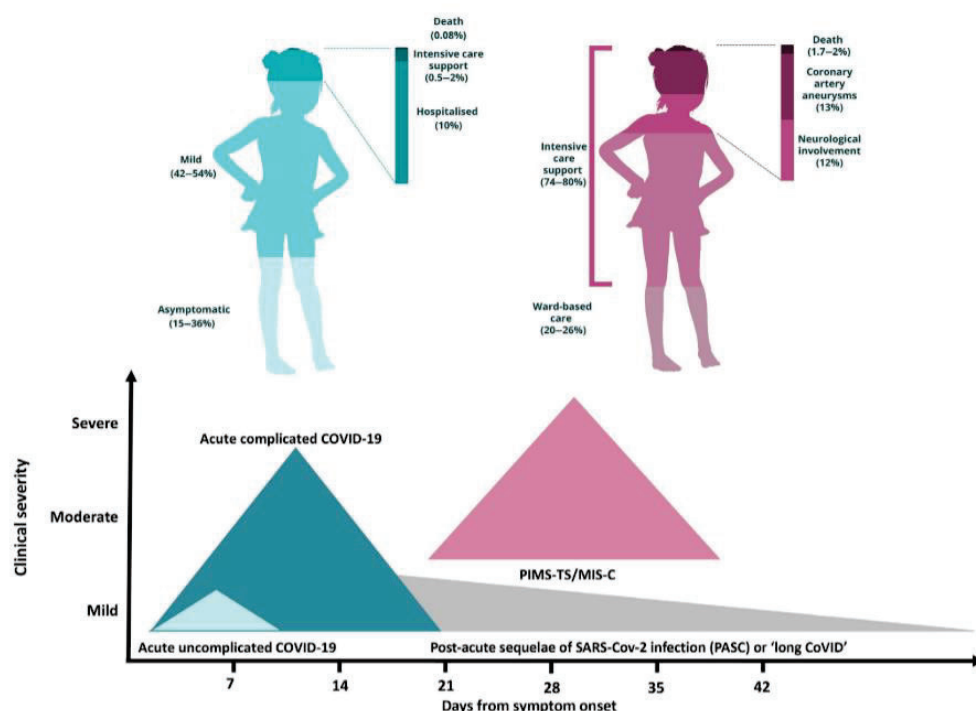
1.5. Manifestaciones clínicas en la edad pediátrica

El impacto de la infección por SARS-CoV-2 en niños es claramente diferente al que se observa en adultos. Para empezar, la incidencia de la enfermedad es muy inferior en la población pediátrica. Ya en la primera ola se observó que, de 44.672 casos confirmados en China, sólo 965 eran menores de edad (47). Lo mismo ocurrió en España, de 113.407 casos analizados, 168 (0,1%) eran menores de 2 años, 64 (0,1%) tenían entre 2 y 4 años y 303 (0,3%) entre 5 y 14 años (48). Aunque hay que interpretar estos datos con cautela, ya que pueden estar subestimados por el número de casos de niños asintomáticos, lo cierto es que a día de hoy los casos reportados en niños representan sólo el 17% del total de población (49).

Además de una menor susceptibilidad a la infección, también se ha visto que los niños desarrollan un curso clínico, en general, mucho más leve y tienen mejor pronóstico. Datos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en España describen que sólo un 0.4-2.8% de los niños infectados desarrollan una COVID-19 grave con necesidad de hospitalización, y de éstos sólo un 0.03-0.16% necesita ingreso en UCI. La tasa de mortalidad también es mucho menor, del 0.001-0.014% (50).

A pesar del menor impacto general de la enfermedad en los niños, el espectro clínico es muy variable, desde la enfermedad aguda (de menor o mayor gravedad), hasta manifestaciones post-infecciosas como el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C) o síndrome multisistémico inflamatorio pediátrico (PIMS), o la perniosis, así como secuelas crónicas como el COVID persistente (*ver Figura 7*).

Figura 7: Espectro de gravedad de la COVID-19 en pacientes pediátricos.



Fuente: Howard-Jones AR, Burgner DP, Crawford NW, Goeman E, Gray PE, Hsu P, et al. COVID-19 in children. II: Pathogenesis, disease spectrum and management. *J Paediatr Child Health*. 2022 Jan;58(1):46-53 (51).

1.5.1. Enfermedad aguda

El SARS-CoV-2, que se transmite del mismo modo que en adultos, tiene un periodo de incubación en la población pediátrica algo más largo, de unos 8-9 días aproximadamente (35). En función de distintos factores como son, la edad y la presencia de comorbilidades (51), como veremos más adelante, los niños manifiestan la COVID-19 aguda de una manera u otra.

1.5.1.1. Manifestaciones leves de manejo ambulatorio

La mayoría de los pacientes pediátricos presentan la COVID-19 con sintomatología leve, e incluso, una gran proporción, estimada por algunos autores de entre el 15 y el 42%, la cursan de manera asintomática (52). Un estudio llevado a cabo en Estados Unidos, que analizó el comportamiento de la infección en 82.798 niños, demostró que el 66% la cursó de forma

asintomática y el 27% de forma leve, es decir, más del 90% de los niños presentó una forma de enfermedad de manejo ambulatorio (53).

Los síntomas que presentan los niños son inespecíficos e indistinguibles de los de cualquier otro resfriado común; los más frecuentes, al igual que en los adultos, son la fiebre (46-64%) y la tos (32-56%). Otros signos o síntomas que se presentan con una frecuencia menor, de entre el 10-20%, son rinorrea, odinofagia, dolor torácico, fatiga, mialgias, manifestaciones cutáneas o síntomas neurológicos como cefalea o mareo. A diferencia de los adultos, en niños son comunes síntomas digestivos como vómitos, diarreas o dolor abdominal y, sin embargo, son infrecuentes las alteraciones en el olfato y el gusto (52,54). Por último, cabe mencionar que en los menores de 12 meses de edad se han descrito presentaciones algo distintas, como fiebre sin foco o invaginación intestinal (55,56).

En cuanto a la duración de la enfermedad leve, se ha reportado que es de unos 6 días de media, y de mayor duración en niños más mayores (7 días en edades de 12-17 años vs. 5 días en edades de 5-11 años) (51,57).

1.5.1.2. Manifestaciones graves de manejo hospitalario

Afortunadamente, solo una pequeña proporción de la población pediátrica presenta síntomas graves y requiere hospitalización (58). Se han descrito varios factores de riesgo asociados a gravedad: la edad inferior a 1 año (sobre todo menores de tres meses), la adolescencia, y la presencia de comorbilidades como enfermedades neurológicas, genéticas o metabólicas, enfermedad pulmonar crónica como el asma, la anemia de células falciformes o la prematuridad. También se han asociado a un mayor riesgo los mismos antecedentes que en adultos: la enfermedad cardiovascular, la obesidad y la diabetes (59,60). En cuanto a la inmunosupresión, aunque de entrada parecería asociarse al desarrollo de una COVID-19 grave, se ha visto que no siempre ocurre así. Aunque algunas inmunodeficiencias primarias, como los defectos congénitos en la respuesta de interferón I, sí que son más susceptibles a presentar una COVID-19 grave, en general la mayoría de las inmunodeficiencias primarias y secundarias en niños se asocian a un buen pronóstico de la infección (61,62).

Aunque no existe una definición estándar de la COVID-19 grave en la población pediátrica, más allá de por la necesidad de hospitalización o ingreso en UCI, algunos autores la han definido como la positividad en una prueba para SARS-CoV-2 sumado a la afectación grave de al menos uno de los siguientes sistemas: respiratorio, cardiovascular, renal, neurológico, gastrointestinal o hematológico. En cuanto a los principales hallazgos clínicos y de laboratorio que se ha demostrado que se asocian al desarrollo de una COVID-19 grave son la disnea, la taquipnea, la taquicardia, la hipotensión y/o la hipoxia al ingreso, así como la elevación de marcadores inflamatorios (como PCR, PCT, IL-6, ferritina o dímero-D) (63,64). La presencia de cualquiera de estos hallazgos debe derivar en una evaluación exhaustiva del paciente y su ingreso.

A continuación, se detallan las principales manifestaciones graves que motivan el ingreso y tratamiento hospitalario en niños.

1.5.1.2.1. Enfermedad pulmonar

Se ha descrito que el 45.9% de los niños que ingresan debido a la infección por SARS-CoV-2 lo hacen por enfermedad pulmonar, concretamente el diagnóstico informado más frecuente es la neumonía con un 41.8% (65–67). Sin embargo, a diferencia de los adultos, hay otras patologías respiratorias debidas a SARS-CoV-2 que motivan el ingreso, como son los broncoespasmos y las bronquiolitis, éstas últimas en una escala mucho menor en comparación con otros virus respiratorios (65).

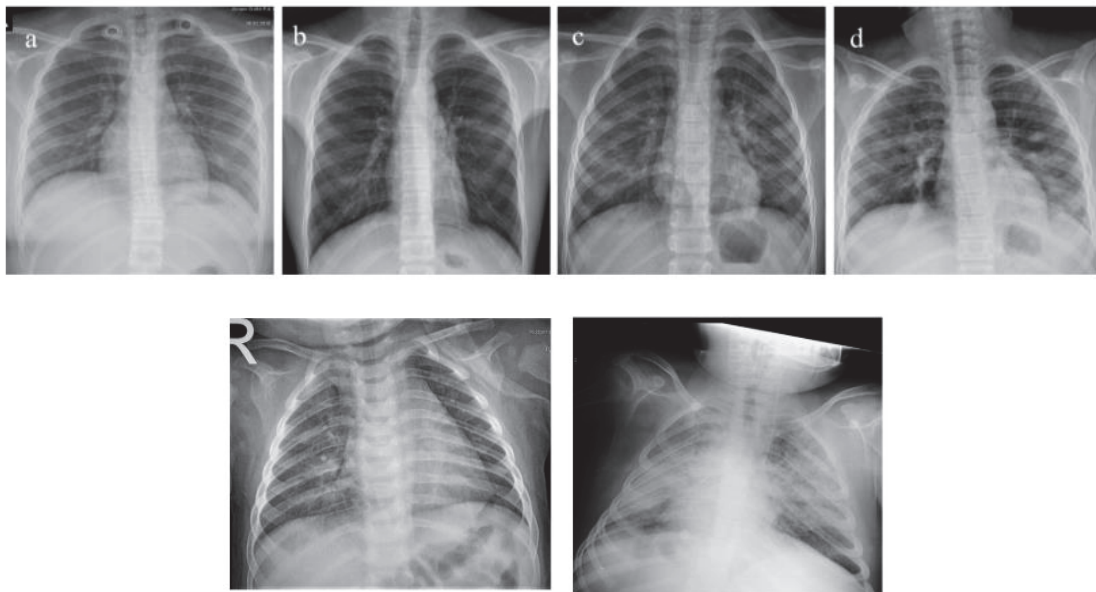
A pesar de ser la neumonía la manifestación más frecuente entre los ingresados, las características clínicas y radiológicas de la neumonía por SARS-CoV-2 en los pacientes pediátricos no están del todo bien definidas. En esta línea, en un estudio realizado en España durante la primera ola de la pandemia se reportó que, de todos los casos de niños ingresados con diagnóstico de neumonía, solo el 20% fueron atribuibles a la infección por SARS-CoV-2 (68). Este dato sugiere que tanto los signos clínicos como radiológicos de la neumonía por SARS-CoV-2 en niños son inespecíficos y difíciles de distinguir de otras causas de neumonía.

Lo que sí sabemos es que parece que la historia natural del desarrollo de neumonía en niños es similar a la de la población adulta. Se ha visto que desde el inicio de los síntomas hasta el

ingreso el tiempo medio transcurrido es de 1 semana, y si el daño pulmonar progresa hacia el desarrollo de un SDRA, éste se manifiesta a partir de la segunda semana (51).

En definitiva, el diagnóstico de neumonía por SARS-CoV-2 se basa en unos signos clínicos y radiológicos inespecíficos (*ver Figura 8*), con unos resultados microbiológicos que confirmen la infección por SARS-CoV-2. Por ello, algunas sociedades recomiendan que, ante cualquier niño con síntomas respiratorios moderados o graves y en todos aquellos con síntomas leves pero con comorbilidades, se debería realizar una radiografía de tórax (o ecografía si está disponible y hay personal entrenado), así como una analítica sanguínea para descartar elevación de parámetros inflamatorios (69).

Figura 8: Distintos patrones radiográficos observados en pacientes pediátricos con neumonía por SARS-CoV-2: desde consolidaciones unilaterales a bilaterales, a un patrón intersticial e imágenes en vidrio deslustrado.



Fuente: Palabiyik F, Kokurcan SO, Hatipoglu N, Cebeci SO, Inci E. Imaging of COVID-19 pneumonia in children. Br J Radiol. 2020 Sep 1;93(1113):20200647 (70).

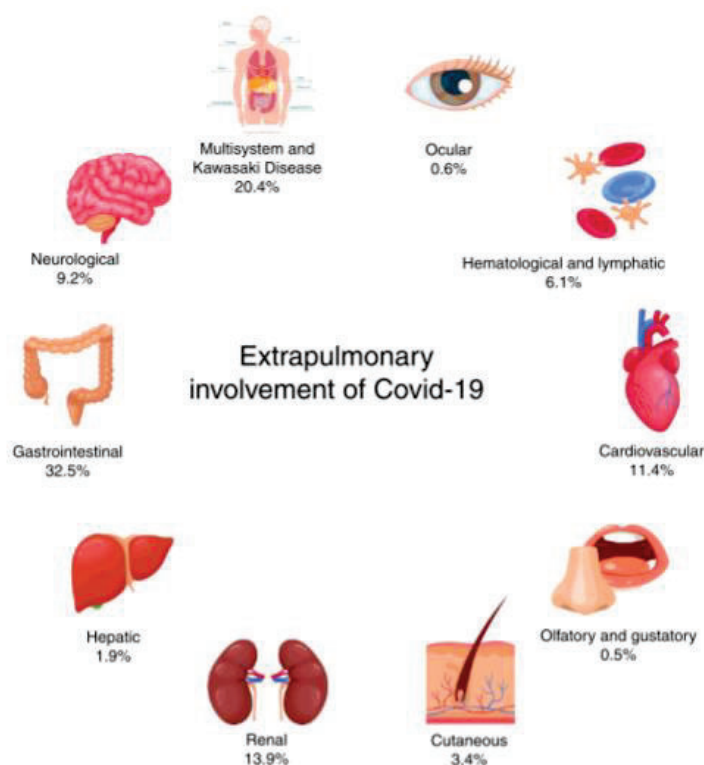
1.5.1.2.2. Manifestaciones extrapulmonares

Las manifestaciones extrapulmonares en los pacientes pediátricos son raras (ocurren en un 5% de los pacientes hospitalizados), pero pueden llegar a ser muy graves. Además, se ha descrito que normalmente coexisten con la enfermedad pulmonar (51) (*ver Figura 9*).

Las más frecuentes son las manifestaciones gastrointestinales, con síntomas como vómitos, diarreas o dolor abdominal, además de cuadros de afectación hepática. A continuación, le siguen las manifestaciones renales, principalmente insuficiencia renal aguda, y las manifestaciones cardiovasculares, como insuficiencia cardíaca, miocarditis, arritmias, cardiomiopatía o infartos (71). Respecto a estas últimas, algunos autores han sugerido realizar un despistaje de afectación cardíaca con la determinación de enzimas cardíacas, electrocardiograma y ecocardiograma en los pacientes hospitalizados, dada su implicación pronóstica (72).

También se han descrito manifestaciones neurológicas, como status epiléptico, encefalopatía, encefalitis, síndrome Guillain-Barré y síndromes desmielinizantes. Por último, otras manifestaciones extrapulmonares que se pueden observar son las hematológicas como anemia grave, trombosis venosa profunda o tromboembolismos pulmonares, las cutáneas como la perniosis, las oculares o las gustativas y olfatorias (71).

Figura 9: Manifestaciones extrapulmonares de la COVID-19 en pediatría.



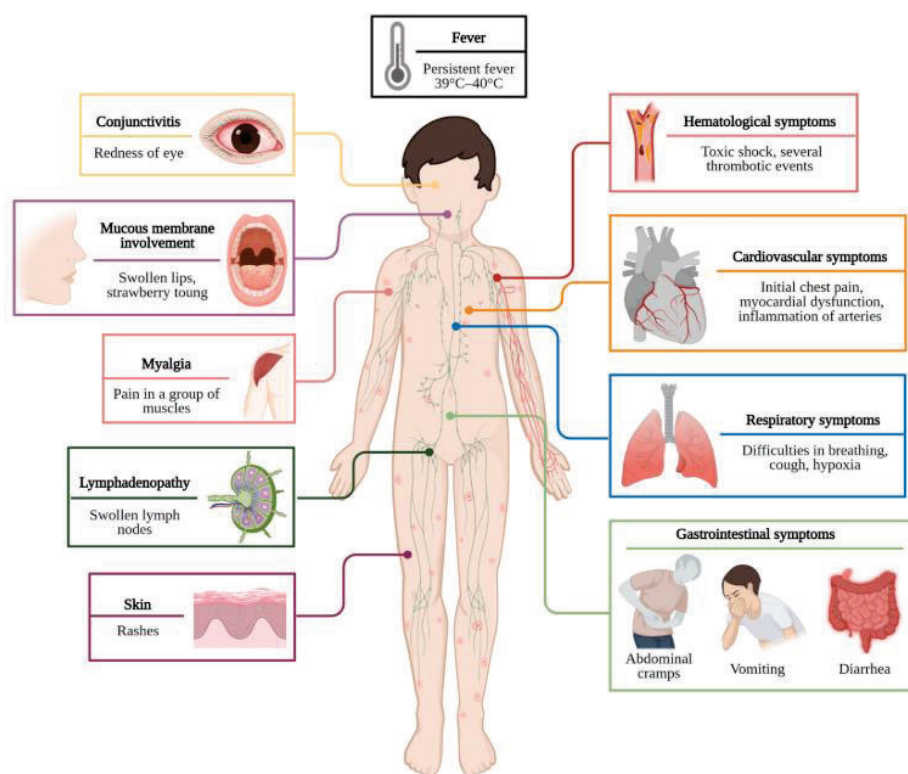
Fuente: Pousa PA, Mendonça TSC, Oliveira EA, Simões-e-Silva AC. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 in children: a comprehensive review and pathophysiological considerations. J Pediatr (Rio J). 2021 Mar-Apr;97(2):116-139 (71).

1.5.2. Manifestaciones post-infecciosas: Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C) y Perniosis

Además de la COVID-19 grave, en abril de 2020 se empezaron a observar niños que presentaban un cuadro clínico característico y grave no observado hasta entonces, y todos ellos tenían en común que habían presentado la infección por SARS-CoV-2 entre 2 y 6 semanas antes (73). A ese cuadro se le denominó síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C), síndrome multisistémico inflamatorio pediátrico (PIMS) o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2 (SIM-PedS) (74–77). Aunque es un cuadro poco común, ya que se ha descrito en <1% de los niños con infección confirmada por SARS-CoV-2, se ha visto que puede llevar al ingreso en UCI dado su rápido inicio y empeoramiento si no se maneja adecuadamente (74).

Las descripciones iniciales de este síndrome mostraron una importante heterogeneidad entre ellas por lo que, a medida que se fueron observando más casos, las principales organizaciones sanitarias establecieron unos criterios diagnósticos consensuados (78–80). Concretamente, la OMS define el síndrome como: niños y adolescentes de 0 a 19 años, con fiebre prolongada (>3 días), biomarcadores inflamatorios elevados y dos de los siguientes: erupción cutánea, conjuntivitis o signos de inflamación mucocutánea, hipotensión o shock, disfunción cardíaca, coagulopatía o síntomas gastrointestinales (*ver Figura 10*). La definición también incluye la ausencia de otras causas bacterianas de inflamación, así como la evidencia de infección previa por SARS-CoV-2 (mediante RT-PCR, test de antígenos o serología positiva) o el haber tenido contacto con un paciente con COVID-19 (80).

Figura 10: Manifestaciones clínicas del síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C).



Fuente: Kundu A, Maji S, Kumar S, Bhattacharya S, Chakraborty P, Sarkar J. Clinical aspects and presumed etiology of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C): A review. Clin Epidemiol Glob Health. 2022 Mar-Apr;14:100966 (81).

A pesar de esta definición precisa, el fenotipo clínico de MIS-C se superpone con otras condiciones inflamatorias como la enfermedad de Kawasaki, la sepsis y el síndrome de shock tóxico estafilocócico o estreptocócico (STSS), lo que complica el diagnóstico diferencial, especialmente durante el primer estadio de la enfermedad, cuando iniciar precozmente un tratamiento específico es crucial (82–84). Además, si bien al comienzo de la pandemia la presencia de IgG anti-SARS-CoV-2 era un marcador útil para distinguir MIS-C de otras entidades, la especificidad de la seropositividad como herramienta de diagnóstico para MIS-C ha disminuido a medida que la inmunidad de la población contra el SARS-CoV-2 ha ido aumentando debido a la exposición continua al virus, las reinfecciones y la vacunación masiva (82,85).

Es importante conocer bien esta entidad, ya que se sabe que ha causado tanta, si no mayor, morbilidad y mortalidad en niños como el impacto directo de la propia enfermedad aguda (86). Se ha descrito que tiene una tasa de mortalidad del 1.9%, debido principalmente a shock y/o disfunción miocárdica, y hasta el 7.3% de los pacientes presentan aneurismas coronarios o datos de disfunción cardíaca residual al alta y durante el seguimiento (74). Afortunadamente, en estudios realizados a largo plazo, se han observado datos prometedores de resolución de estas secuelas cardiológicas (87).

Por otro lado, cabe mencionar otra entidad post-infecciosa que ocurre en algunos niños: la perniosis. Se trata de una manifestación cutánea con lesiones tipo máculo-pápulas purpúricas, de aspecto vasculítico, en zonas acrales. Clásicamente este tipo de lesiones se ha asociado a ambientes de frío intenso, sin embargo, durante las primeras olas de la pandemia se empezaron a ver muchos casos en población pediátrica y adultos jóvenes que, por otro lado, no tenían síntomas de COVID-19 ni tampoco una confirmación microbiológica de estar presentando de forma aguda ni de haber presentado en el pasado la infección (88). Sin embargo, aunque la fisiopatología de esta entidad no está del todo esclarecida, se confirmó que estas lesiones tenían asociación con el SARS-CoV-2, por un lado confirmándose la presencia de virus en estudios histológicos (89) y, por otro, observando una regulación exagerada de la vía de IFN-I probablemente secundaria a la infección por SARS-CoV-2 (90).

1.5.3. Secuelas crónicas: COVID persistente

En cuanto a la morbilidad secundaria a la infección por SARS-CoV-2, también debemos destacar el “*long COVID*” o “COVID persistente”. Este mismo cuadro también se ha descrito en adultos (91,92). Existe una marcada heterogeneidad en los estudios sobre COVID persistente en niños debido a que no existen unos claros criterios de inclusión ni un seguimiento a largo plazo de estos pacientes, pero se estima que tiene una prevalencia que varía entre el 4 y el 66% (93–95). Aunque a día de hoy no existe una definición precisa, se trata de la persistencia de síntomas durante o hasta 3 meses después de la infección aguda y que se mantienen de forma continua o fluctuante durante más de 8 semanas. Se ha visto que ocurre principalmente en niños mayores de 12 años, y se caracteriza por una amplia constelación de síntomas que impiden al paciente retomar sus actividades habituales de la vida diaria, e incluyen insomnio, dificultad para respirar, dolor torácico, congestión nasal, fatiga, mialgias o dificultad para concentrarse, entre otros. Este síndrome se ha descrito tanto en pacientes que presentaron una COVID-19 aguda grave como leve. Es importante detectar estos casos de forma precoz y ofrecer apoyo, detectar síntomas y signos de gravedad, descartar otras enfermedades parecidas, y valorar si precisan algún tratamiento sintomático y rehabilitador (96–98).

1.5.4. Impacto real en la hospitalización

Respecto a la necesidad real de hospitalización por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos, la mayoría de los estudios se han centrado en la descripción de casos de enfermedad grave que requieren ingreso en UCI, como el MIS-C (99). Sin embargo, dado el bajo impacto global de esta infección en niños, existen pocos estudios que evalúen la tasa total de hospitalización en esta población, considerando tanto los casos graves como los moderados, y tanto la enfermedad aguda como las manifestaciones post-infecciosas.

En general, las tasas de hospitalización pediátrica reportadas en los países occidentales han sido bajas durante la pandemia (100,101), salvo un aumento notable durante la ola de la variante Ómicron (B.1.1.529) (102). En un estudio realizado en Estados Unidos a principios de 2022, las tasas de hospitalización por COVID-19 en niños de 0 a 4 años aumentaron cinco veces en comparación con las tasas de hospitalización para la misma edad durante los meses

anteriores. Este aumento planteó una preocupación por el impacto de las nuevas variantes en la población pediátrica, aunque también se justificó por el hecho de que la población de 0 a 4 años era el único grupo de edad que aún no tenía acceso a la vacunación en ese momento (102).

Considerando el cribado universal de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes ingresados que se ha venido implementado en la mayoría de los hospitales durante la pandemia, algunos estudios han sugerido que la tasa de hospitalización en los niños puede reflejar la prevalencia comunitaria más que la gravedad real de la enfermedad, lo que estaría sobreestimando el número de casos que necesitan un manejo hospitalario (103). Es por ello importante realizar estudios que evalúen la tasa de población pediátrica que realmente ingresa debido a la infección por SARS-CoV-2.

1.6. Diferencias reportadas entre adultos y niños

Como hemos visto, las manifestaciones clínicas de la COVID-19 son muy dispares entre adultos y niños, y el motivo de estas diferencias no está del todo esclarecido. Desde el punto de vista inmunitario, se parte de la teoría de que, a mayor edad, más debilitado está el sistema inmune del individuo y, por tanto, más inadecuada e insuficiente será la respuesta inmunitaria ante una infección como puede ser el SARS-CoV-2 (104–106).

Hasta la fecha, algunas de las razones propuestas que podrían explicar la menor severidad de la COVID-19 en los niños son: tienen mayores títulos de anticuerpos neutralizantes (debido a la protección cruzada secundaria a la exposición a otros coronavirus endémicos o al efecto protector de otras vacunas de virus vivos), tienen menor expresión de receptores de ECA2 y de la proteasa TMPRSS2 en el epitelio nasal, tienen una respuesta inmune innata más eficaz (especialmente en la mucosa nasal), tienen células T y B inmaduras y una mayor cantidad de linfocitos T reguladores responsables de una respuesta inmune adaptativa menos específica pero más inmediata y potente, y tienen menor producción de IL-6 y TNF- α , hecho que limita la progresión de la respuesta inflamatoria. Otras hipótesis que se han planteado son que existe una mayor interferencia entre el SARS-CoV-2 y otros virus en el tracto respiratorio de los niños, lo que puede conducir a una menor carga viral del SARS-CoV-2, o también que

existen diferencias en el endotelio del aparato respiratorio o en el microbioma nasofaríngeo relacionadas con la edad (104–106).

1.7. Transmisión

Respecto a la transmisión del SARS-CoV-2, se han identificado varias vías de contagio, siendo las relacionadas con la vía respiratoria las principales (107–109). Las detallamos a continuación (ver *Tabla 2*):

Tabla 2. Vías de transmisión del SARS-CoV-2.	
Gotas respiratorias (diámetro 100-1000 micrómetros)	Se emiten al hablar, respirar, toser y estornudar, a una distancia de 1-2 metros. El contagio principalmente es directo (a través de la boca, nariz o conjuntiva), aunque también puede ser indirecto (a través de fómites en el entorno inmediato de la persona infectada). La mayoría de estudios coinciden en que es la vía más importante de transmisión.
Aerosoles (diámetro <100 micrómetros)	Se emiten de la misma forma que las gotas, pero, debido a su pequeño tamaño, se mantienen suspendidos en el aire durante largo tiempo, y de este modo pueden llegar a mayores distancias. Se consideran la vía principal de contagio en espacios cerrados con poca ventilación.
Contacto directo con personas infectadas o superficies contaminadas	Se ha demostrado que el SARS-CoV-2 puede mantenerse viable en superficies hasta 72 horas, e incluso hasta 6 días en plásticos o acero inoxidable. Aun así, las cargas virales en superficies son muy inferiores a las que se pueden encontrar en nasofaringe, por lo que esta vía de contagio se considera minoritaria.
Heces	Se ha detectado excreción del virus en heces sobre todo en niños, y durante varios días. Sin embargo, no se ha demostrado transmisión fecal-oral de la infección a través de esta vía.

Madre-hijo	Por un lado, por transmisión vertical durante el embarazo, y por otro a través de la leche materna. Se han publicado casos aislados, por lo que estas vías se consideran poco probables. Por ello, organismos internacionales como la OMS, recomiendan a las mujeres infectadas realizar una lactancia materna en condiciones normales, ya que los beneficios superan a los riesgos.
Otras	No se ha podido demostrar transmisión a través de la sangre (transfusiones), vía sexual, ni transmisión desde animales domésticos a humanos.

Fuente: Comité/Grupo de Pediatría Basada en la Evidencia de la AEP y AEPap. COVID-19 en Pediatría: valoración crítica de la evidencia [Internet]. 2022 Feb [consultado 7 Nov 2023].

Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-pediatria-basada-en-evidencia/documentos/covid-19-en-pediatria-valoracion-critica-evidencia> (107).

Por otro lado, el riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 depende de varios factores (ver Tabla 3):

Tabla 3. Factores de riesgo de transmisión del SARS-CoV-2.	
Relacionados con el emisor	• Carga viral: se ha descrito que, a mayor carga viral, mayor gravedad clínica y mayor es el periodo de transmisibilidad hacia los demás. • Cantidad de gotas respiratorias y aerosoles emitidos: depende de la actividad desarrollada, es decir, será menor al respirar o hablar tranquilamente y aumentará al gritar, toser, durante el ejercicio físico... • Tiempo de emisión: se ha descrito que se puede transmitir el virus desde 2-3 días antes del inicio de los síntomas hasta 10 días aproximadamente en enfermedad leve-moderada o hasta 20 días en enfermedad grave, e incluso más tiempo en inmunodeprimidos.

Relacionados con el receptor	• Volumen de aire inhalado. • Tiempo de exposición. • Distancia del emisor. • Predisposición individual: mayor si edad avanzada o comorbilidades, aunque también depende de otros factores poco conocidos como la cantidad y/o funcionalidad individual de los receptores de ECA2.
Relacionados con el escenario	• Nivel de transmisión comunitaria. • Espacios comunes abiertos o cerrados, ventilación. • Medidas de prevención y control de la infección, etc.

Fuente: Comité/Grupo de Pediatría Basada en la Evidencia de la AEP y AEPap. COVID-19 en Pediatría: valoración crítica de la evidencia [Internet]. 2022 Feb [consultado 7 Nov 2023].

Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-pediatria-basada-en-evidencia/documentos/covid-19-en-pediatria-valoracion-critica-evidencia> (107).

Como en otras infecciones, para describir la dinámica de transmisión del SARS-CoV-2 en la población durante la pandemia se han utilizado varias variables que conviene conocer (ver *Tabla 4*):

Tabla 4. Variables utilizadas para el estudio de la transmisión del SARS-CoV-2.	
R_0 (número básico reproductivo)	Media de casos secundarios que se producen a partir de un caso primario o índice. Depende fundamentalmente del número de contactos sociales.
R_e (número reproductivo efectivo)	Media de cuantas personas se han contagiado cada día a partir de los casos existentes observados. A diferencia del R_0 , que es un cálculo teórico, el R_e es una variable que tiene en cuenta la observación a tiempo real de la enfermedad y permite seguir su evolución dinámica. Tanto esta variable, como el R_0 , se han utilizado a lo largo de la pandemia para establecer las distintas medidas de aislamiento y prevención en la población.

K (factor de dispersión)	Variación con la que se distribuyen los casos secundarios respecto a un caso primario o índice. La utilidad de esta variable radica en que, como se ha demostrado, la transmisión del SARS-CoV-2 no es homogénea, ya que no todos los casos primarios contribuyen de la misma forma a la transmisión de la enfermedad. Se ha visto que a pesar de tener una R_0 de 2-3, por ejemplo, algunos casos primarios no producirán ningún caso secundario, otros producirán 2-3 casos secundarios, y otros producirán múltiples casos secundarios (los llamados super-diseminadores). Con el cálculo de la variable k, algunos estudios han demostrado que el 80% de los casos secundarios están producidos por sólo el 10-20% de los casos primarios (110).
TAS (Tasa de Ataque Secundario)	Número de casos secundarios que aparecen dentro del periodo de incubación entre los contactos susceptibles. Es una variable que depende fundamentalmente de las condiciones en las que se produce la transmisión, es decir, de los factores relacionados con el escenario.

Fuente: Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias - Ministerio de Sanidad.

Información científica-técnica sobre parámetros epidemiológicos [Internet]. Enero 2022

[consultado 8 Nov 2023]. Disponible en:

https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/20220113_EPIDEMIOLOGIA.pdf (111).

Por último, comentar que se ha demostrado que el SARS-CoV-2 también puede transmitirse, en menor medida, desde individuos asintomáticos y presintomáticos, aunque se desconoce el momento de máxima infectividad de estas personas (112).

1.7.1. Papel de los niños en la transmisión

Basándose en datos de otras infecciones virales como la gripe, al inicio de la pandemia se planteó la hipótesis de que los niños podían ser los principales transmisores de la infección por SARS-CoV-2. Se pensó que, debido a la poca clínica que presentaban, con un curso de la enfermedad mucho más leve que los adultos, podían actuar como reservorio de la infección y, por tanto, diseminarla a otras personas. Por ello, se planteó que debían ser uno de los principales objetivos del confinamiento, dirigiendo las políticas sociales y de salud pública hacia el cierre temporal de colegios y guarderías con tal de contener la infección y proteger a los adultos más vulnerables (113–115).

Posteriormente, se puso de manifiesto que los niños tienen una menor carga viral, lo que justifica que tengan menos síntomas y que, por tanto, transmitan menos la enfermedad en comparación con los adultos (116–119). Además, se llevaron a cabo diferentes estudios acerca del papel de los niños en la transmisión en escuelas (120–122), campamentos de verano (123), así como a nivel intrafamiliar (117,124,125), observando que en la mayoría de los casos los niños no eran el caso índice. Por ello se concluyó que, a pesar de que los niños puedan transmitir el virus, es poco probable que sean los principales diseminadores de esta enfermedad. Todos estos estudios, realizados en menores de 12-15 años y principalmente en centros escolares y en domicilios, tuvieron gran impacto para poder “desaislar” a la población infantil, y poder reabrir los colegios y guarderías en septiembre de 2020.

Sin embargo, a lo largo de las sucesivas olas, en la mayoría de los países también se optó por limitar las actividades deportivas, dado que se consideraba el deporte una actividad con alto potencial de transmisión de la infección tanto por el mayor contacto como por la gran emisión de aerosoles y gotas respiratorias demostrada con el ejercicio físico (126). Aun así, no había datos de calidad que respaldaran tales decisiones, con poca investigación en entornos deportivos, y menos en concreto en el deporte infanto-juvenil, un área en la que se debería hacer más énfasis dada su importante contribución a la salud general, la salud mental y el rendimiento escolar de los menores. De hecho, algunos estudios vieron los efectos nocivos de limitar la actividad física de los niños y adolescentes, no solo afectando a su aprendizaje, sino también a su capacidad para mantener un nivel de actividad física recomendado (127), así como deteriorando su salud mental (128).

1.8. Prevención

Tanto las medidas físicas de prevención, como la vacunación, han sido fundamentales para la contención de la infección durante la pandemia. Las principales medidas físicas que han demostrado, tanto en adultos como en niños, eficacia para evitar los contagios son la higiene de manos frecuente, la distancia social, la ventilación de los espacios cerrados y el uso de mascarilla. Organismos internacionales como la OMS o los CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) también ofrecen pautas de actuación para que cuando una persona se infecte, evite el contagio hacia los demás (129,130).

Respecto a la vacunación, en esta pandemia la población ha tenido acceso a vacunas eficaces, desarrolladas en tiempo récord y con gran esfuerzo tanto técnico por parte de las instituciones científicas, como económico por parte de las instituciones gubernamentales. Se han diseñado varios tipos de vacunas, desarrolladas con distintas tecnologías, principalmente con ARN mensajero y con vectores víricos. En diciembre de 2020, tan sólo un año después del aislamiento del SARS-CoV-2, la *European Medicines Agency* (EMA) y la *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* (AEMPS) aprobaron la primera vacuna para su administración a la población más vulnerable (ancianos, personas dependientes y personal sanitario), un acontecimiento sin precedentes. Para el desarrollo de esta vacuna fue necesario encontrar las secuencias de ADN que codificasen antígenos esenciales del virus, para después transcribirlas y obtener el ARN mensajero correspondiente. A partir de esta primera indicación, se fueron aprobando nuevas indicaciones a personas de menor edad. La primera campaña de vacunación contra el SARS-CoV-2 en España para la población entre 16 y 29 años comenzó el 30 de junio de 2021. La campaña para la población entre 12 y 15 años inició el 4 de agosto de 2021, y la de la población entre 5 y 11 años inició el 15 de diciembre de 2021. No fue hasta un año después, el 19 de octubre de 2022, que en la Unión Europea se aprobó la vacunación para los niños de entre 6 meses y 5 años (131).

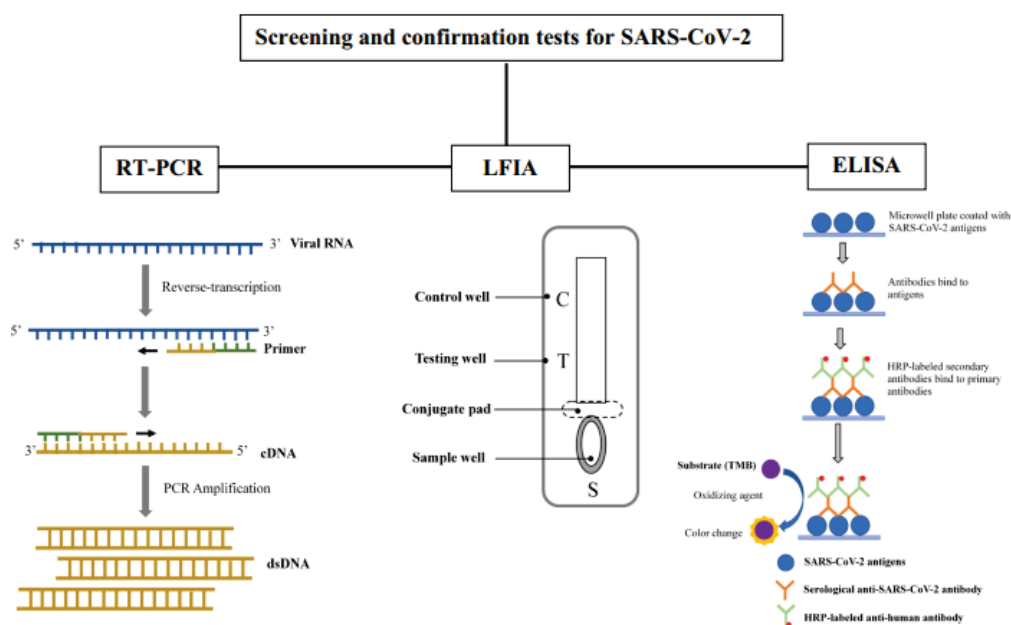
1.9. Diagnóstico

La identificación y el rápido aislamiento de las personas infectadas por SARS-CoV-2 durante esta pandemia ha sido crucial. Como hemos comentado, el diagnóstico de la COVID-19 se basa en características clínicas, de laboratorio y radiológicas. Sin embargo, como dichas

características son inespecíficas, la infección debe confirmarse siempre mediante una técnica microbiológica.

Existen tres métodos para demostrar la infección: las pruebas de detección de ARN, las pruebas de detección de antígenos y las pruebas de detección de anticuerpos (132,133) (ver Figura 11). Durante los primeros meses de la pandemia fue muy importante saber diagnosticar con certeza la presencia o ausencia de enfermedad, por lo que el empleo de las pruebas de detección de ARN fue fundamental. Posteriormente, se fueron añadiendo nuevas necesidades como rapidez en la obtención de resultados, posibilidad de hacer cribados masivos o estudios epidemiológicos poblacionales, y también abaratar costes, por lo que ganaron importancia las pruebas de detección de antígenos y anticuerpos.

Figura 11: Pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2: detección de ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), detección de antígenos mediante inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) y detección de anticuerpos mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).



Fuente: Shafie MH, Antony Dass M, Ahmad Shaberi HS, Zafarina Z. Screening and confirmation tests for SARS-CoV-2: benefits and drawbacks. Beni Suef Univ J Basic Appl Sci. 2023;12(1):6 (134).

1.9.1. Pruebas de detección de ARN

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR, o qRT-PCR si se cuantifica en tiempo real) es la técnica *gold-standard* para el diagnóstico del SARS-CoV-2 y se basa en amplificar la secuencia genética específica del virus. Existen múltiples kits de RT-PCR en el mercado, aunque la mayoría se basan en la amplificación de 3 genes: aquellos que codifican las proteínas de la envoltura (E), la nucleocápside (N) y la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Los resultados, que se obtienen en horas-pocos días, pueden ser: positivo (cuando se detectan al menos dos genes virales), negativo (cuando no se detecta ningún gen) e indeterminado o no concluyente (cuando sólo se detecta uno de los genes y, por tanto, se requiere repetir la prueba). Se han obtenido resultados positivos en infectados tanto en muestras respiratorias como no respiratorias (saliva, orina, heces, sangre). No obstante, las más usadas y recomendadas por su rentabilidad diagnóstica son las nasofaríngeas seguidas de las orofaríngeas. En infecciones graves, se pueden recoger muestras de vías respiratorias bajas, como esputo, aspirado endotraqueal o incluso lavado broncoalveolar, en las que se ha encontrado positividad incluso tras 3 semanas del inicio de la clínica (132,133,135).

Como hemos comentado anteriormente, el periodo de máxima sensibilidad de la RT-PCR es en la primera semana desde el inicio de los síntomas (*ver Figura 12*). Tanto en los primeros días del periodo de incubación, como tras la resolución de la clínica, la carga viral es menor y podría no ser detectada. De hecho, en los pacientes asintomáticos a los que se realiza el estudio de contactos, se recomienda realizar la prueba entre el 5º y 7º día post-exposición. Aunque la sensibilidad y especificidad de esta técnica son elevadas, del 85-90% y de casi el 100% respectivamente, también puede haber falsos negativos (por muestra insuficiente o poca carga viral) y, aunque menos frecuentemente, falsos positivos (por contaminación cruzada). Hay que tener en cuenta que un resultado negativo no excluye infección, si el resto de datos clínicos, de laboratorio o radiológicos son de alta sospecha. En esos casos, se recomienda repetir la prueba a las 48-72 horas. Lo mismo ocurre con la interpretación de un resultado positivo, que no siempre se traduce en replicación viral y capacidad infectiva, ya que se puede detectar RNA no viable (135,136).

Por último, describir el concepto de ciclo de umbral de positividad o *cycle threshold* (Ct), que se refiere al número de ciclos en una RT-PCR necesarios para amplificar el ARN para poderlo

detectar, por tanto, un valor Ct bajo refleja elevada carga viral y viceversa. Se ha consensuado que un Ct>30 puede corresponder a un virus potencialmente no infeccioso, y este dato se ha utilizado en los distintos protocolos para finalizar el aislamiento de los pacientes (135,136). En el caso concreto de las reinfecciones, para poderlas diferenciar de los casos de PCR persistentemente positiva, además de con la obtención de unos Ct<30, se ha decidido definir las reinfecciones como la recidiva de síntomas con una prueba RT-PCR positiva después de 90 días tras un resultado positivo inicial de la prueba (137).

1.9.2. Pruebas de detección de antígenos

Las pruebas de detección de antígenos se basan en detectar, mediante inmunoensayo de flujo lateral (LFIA; *lateral flow immunoassay*), las proteínas virales como la proteína N y las subunidades S1 o S2 de la proteína *spike* (S). Se realizan en muestras de nasofaringe, orofaringe o esputo. El momento óptimo para realizarlas es en los primeros 5-7 días del inicio de los síntomas, es decir, cuando ocurre mayor replicación viral (132,133) (*ver Figura 12*).

Su sensibilidad en personas sintomáticas supera el 95%, siendo más elevada cuanto mayor viremia existe, y la especificidad es del 95-99%. En personas asintomáticas estos datos son mucho menores, por lo que en estos casos es recomendable usar la RT-PCR. También puede tener falsos negativos y positivos. Al no ser tan sensibles para detectar cargas virales bajas, un resultado negativo de una prueba de antígenos no descarta la infección, por lo que se recomienda realizar una RT-PCR si la sospecha clínica es elevada (135,136).

Dado que ofrecen un resultado inmediato, como hemos comentado anteriormente, estas pruebas ganaron mucha importancia en situaciones de brotes o de cribados masivos, pudiendo así identificar rápidamente a los infectados y así tomar las medidas adecuadas de aislamiento (135,136).

1.9.3. Pruebas de detección de anticuerpos

Por último, las pruebas de detección de anticuerpos detectan inmunoglobulinas de tipo M, A o G (IgM, IgA e IgG) contra antígenos del SARS-CoV-2 (principalmente las proteínas N y S), en muestras de sangre, ya sea plasma o suero. Las técnicas principales son el ensayo por

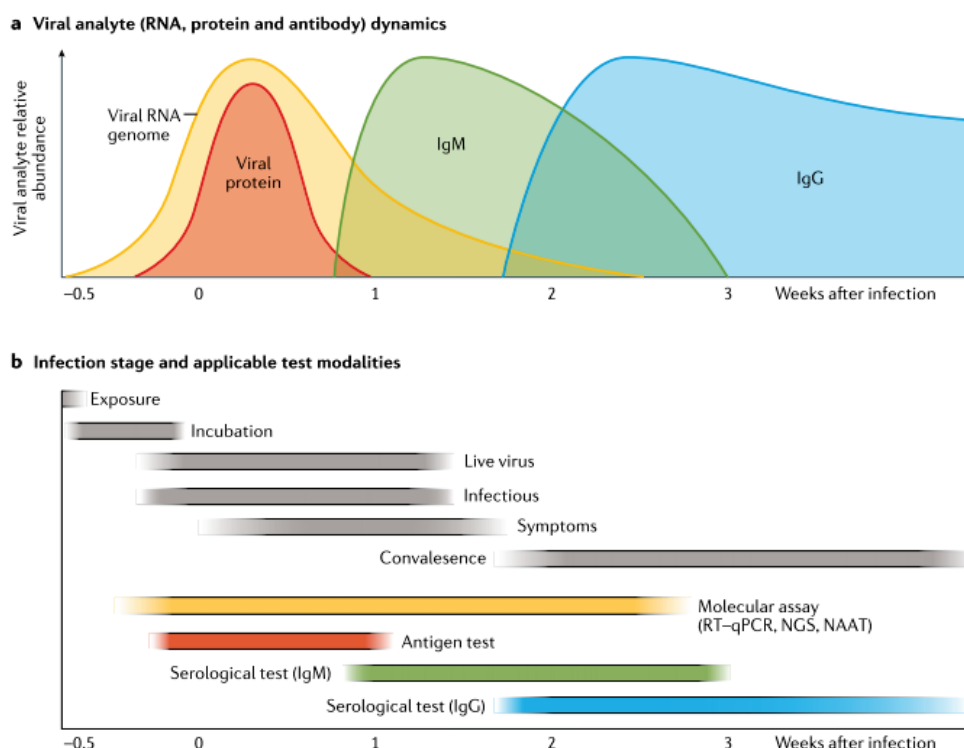
inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; *enzyme-linked immunosorbent assay*), considerado prueba de alto rendimiento y que se debe realizar en un laboratorio, y el LFIA, que se utiliza para los test rápidos mediante muestra de sangre capilar (132,133).

En la mayoría de los pacientes infectados, se pueden detectar anticuerpos en los primeros 15 días después del inicio de la clínica. Estas pruebas ayudan a identificar a los pacientes que han sido infectados previamente, así como a diagnosticar infección reciente a partir de las 3-4 semanas. Su sensibilidad varía en función del tiempo desde el inicio de los síntomas, siendo del 50-75% a los 6-10 días, del 75-90% a los 10-20 días y mayor al 90% a partir de los 20 días. Su especificidad es del 90-99%. Por lo tanto, el momento óptimo para determinar IgM es a los 7-14 días del inicio de los síntomas, e IgG a los 15-21 días, cuando presumiblemente ya habrá ocurrido la seroconversión (135,136) (*ver Figura 12*).

La persistencia de anticuerpos a lo largo del tiempo y su relación con la capacidad de protección continúan siendo motivo de estudio, aunque se ha demostrado que en la mayoría de las personas las IgG persisten durante al menos varios meses y se asocian a un cierto nivel de protección frente a la reinfección (138). En asintomáticos o casos leves, el título de anticuerpos suele ser menor, pueden no ser detectables o incluso serorevertir a las pocas semanas (139). Sin embargo, se ha descrito que en estos casos la respuesta inmune humoral puede mantenerse incluso con la falta de detección de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo (140). Del mismo modo, no se recomienda la detección de anticuerpos para evaluar el nivel de protección después de la vacunación o para evaluar la necesidad de vacunación en una persona no vacunada (133).

Debido a la baja sensibilidad de la detección de anticuerpos en las primeras semanas de la infección, las pruebas serológicas tienen utilidad limitada en el diagnóstico de la infección aguda, que se basa como hemos dicho en las técnicas de RT-PCR y/o de detección de antígenos, y su uso se halla prácticamente restringido a los estudios de seroprevalencia o para el diagnóstico de los casos de MIS-C (133). Por último, mencionar que la síntesis de anticuerpos inducida por la vacuna también tiene implicaciones en la interpretación de estas pruebas, ya que las personas vacunadas solo pueden ser positivas para anticuerpos contra antígenos de la proteína S, pero no contra antígenos de la proteína N, por lo que la presencia de IgG frente a la proteína N indicaría antecedente de infección por SARS-CoV-2 (133).

Figura 12: Pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2, en qué momento es útil cada una.



Fuente: Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. Nat Rev Genet. 2021 Jul;22(7):415-426 (141).

1.9.4. Interpretación de las pruebas diagnósticas

A lo largo de la pandemia han ido modificándose las distintas definiciones de infección aguda, subaguda o pasada. Por ejemplo, con respecto a la definición de infección aguda, a principios de 2020 se consideraba cuando se obtenía una RT-PCR positiva, tanto si había o no síntomas asociados, o cuando se obtenía un resultado positivo para IgM. Sin embargo, posteriormente se dejó de usar las IgM para el diagnóstico de infección aguda, y se introdujeron las variables de tiempo desde la última RT-PCR positiva y tiempo desde el inicio de la sintomatología, así como los Ct para poder diferenciar una infección aguda de una subaguda o pasada.

Lo cierto es que la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas depende fundamentalmente de la correlación con la clínica (presencia o no de síntomas y duración de los mismos, así como gravedad de la enfermedad) y del contexto epidemiológico. Además,

también depende directamente de las reinfecciones, y por supuesto, desde finales de 2020, del estado vacunal.

Así pues, la definición de casos actualmente más aceptada sería (*ver Tabla 5*):

Tabla 5. Definición de casos según la interpretación de las pruebas diagnósticas.	
Caso sospechoso	• Persona que cumple criterios clínicos compatibles, pero que aún no dispone de resultado de RT-PCR o antígeno. Si la persona presentó una prueba diagnóstica positiva hace más de 90 días, se considera entonces un caso sospechoso de reinfección.
Caso confirmado con infección activa	• Persona que cumple criterios clínicos compatibles, y dispone de una RT-PCR o antígeno positivos. • Persona asintomática con RT-PCR o antígeno positivos, y sin datos de haber pasado la infección en los 90 días previos.
Caso con infección resuelta	• Persona asintomática NO vacunada en la que se descarta la infección activa con resultado positivo de IgG contra las proteínas S y/o N, por serología de alto rendimiento. • Persona asintomática vacunada en la que se descarta la infección activa con resultado positivo de IgG contra la proteína N, por serología de alto rendimiento.
Caso probable	• Persona con criterios clínicos y radiológicos compatibles, con resultados negativos o indeterminados en RT-PCR o antígeno, pero con vínculo epidemiológico con un caso confirmado. • Persona con criterios clínicos y epidemiológicos compatibles, con pruebas diagnósticas repetidamente negativas (al menos una RT-PCR) pero serologías de alto rendimiento positivas para SARS-CoV-2 (IgM y/o IgG contra la proteína N).
Caso descartado	• Caso sospechoso con RT-PCR o antígeno negativos, sin alta sospecha clínica ni vínculo epidemiológico con un caso confirmado.

Fuente: Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, Departament de Salut - Generalitat de Catalunya. Procediment d'actuació enfront de casos d'infecció pel nou coronavirus SARS-CoV-2 [Internet]. 2022. [consultado 14 Nov 2023];

Disponible en:

https://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspcat/vigilancia_salut_publica/COVID-19/protocols/procediment-actuacio-coronavirus.pdf (142).

1.9.5. Papel de la saliva como muestra diagnóstica

Varias investigaciones han evaluado el papel de la saliva como muestra de estudio del SARS-CoV-2, ya que se considera de gran utilidad en situaciones en las que no se puede, o es más complicado, obtener muestra de nasofaringe u orofaringe, especialmente en los primeros días de la enfermedad y en pacientes pediátricos. La saliva tiene la ventaja de ser una muestra no invasiva, de fácil obtención, y que se puede recoger de forma autónoma, por lo que además se considera una alternativa en el contexto de Salud Pública, por ejemplo, para población asintomática que requiere controles con cierta asiduidad (en centros escolares, ámbito deportivo, etc) (133,143).

Al ser el SARS-CoV-2 un virus respiratorio, se ha visto que la inmunidad de barrera que confiere la mucosa respiratoria es clave, en la que juega un importante papel la IgA (144). Por ello, la saliva podría ser una muestra atractiva para realizar el despistaje de la infección, tanto a través de RT-PCR, antígeno o incluso serologías, y por tanto ser un buen método para estudiar la transmisión en la población pediátrica (145–147). Además, en el caso concreto de la determinación de anticuerpos, el uso de saliva tendría su utilidad también para estudios de seroprevalencia y para conocer el diagnóstico serológico tras la vacunación (143).

1.10. Tratamiento

El tratamiento, tanto de los pacientes pediátricos como de los adultos, de la COVID-19 que cursa con síntomas respiratorios leves se basa fundamentalmente en el seguimiento ambulatorio y el manejo de los síntomas con analgésicos y antipiréticos. En casos de síntomas

respiratorios graves o en pacientes de alto riesgo, el tratamiento se detalla a continuación (ver Tabla 6):

Tabla 6. Tratamiento de la COVID-19 en pacientes pediátricos.		
COVID-19 con síntomas respiratorios leves	Pacientes de bajo riesgo	Seguimiento ambulatorio y manejo de los síntomas con analgésicos y antipiréticos.
	Pacientes de alto riesgo: • Receptores de trasplantes de órgano sólido, médula ósea o CAR-T (receptor de antígeno quimérico de células T). • Pacientes con inmunodeficiencias primarias (combinadas o de células B con ausencia de respuesta vacunal). • Pacientes bajo tratamiento inmunosupresor o quimioterapia intensiva. • Pacientes con fibrosis quística o patología crónica con dependencia de respirador. • Pacientes bajo tratamiento sustitutivo renal. • Pacientes con infección por VIH.	• Nirmatrelvir/Ritonavir oral (Paxlovid®) en mayores de 12 años y más de 40 kg si como mucho han pasado 5 días desde el inicio de los síntomas. • Remdesivir endovenoso, que se puede administrar a partir del mes de vida y los 3 kg de peso en los primeros 7 días de clínica.
COVID-19 con síntomas respiratorios graves	• Tratamiento específico para el broncoespasmo o la bronquiolitis (si es que van asociados). • Tratamiento con dexametasona oral o endovenosa siempre que sea necesaria oxigenoterapia para mantener SatO₂>93%. • Valorar de forma individual el riesgo de trombosis (contextos de encamamiento, obesidad, vías centrales...), sobre todo en	

	adolescentes, e iniciar profilaxis con heparina de bajo peso molecular cuando sea necesario. • Si el paciente se encuentra en los primeros 7 días desde el inicio de los síntomas y no precisa ventilación mecánica invasiva ni terapia con oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), se recomienda administrar Remdesivir endovenoso. • Si el paciente presentara progresión clínico-analítica a pesar del tratamiento previo, sin datos de coinfección bacteriana o fúngica, se debe considerar administrar Tocilizumab o Baricitinib. Si bien es cierto, que en la actualidad no se considera recomendable el uso rutinario de estos anticuerpos monoclonales debido a la pérdida de actividad frente a las variantes actualmente circulantes.
--	--

Fuente: Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Tratamiento del paciente pediátrico con COVID-19 y síntomas respiratorios leves-moderados [Internet]. 2023 Sep [consultado 15 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.seipweb.es/wp-content/uploads/2023/09/Tratamiento-Cambios-COVID-leve-moderado-y-grave.-SEIP-v1.6.pdf> (148).

Por último, los pacientes con MIS-C tienen un tratamiento específico que se basa en el tratamiento de soporte (fluidoterapia, tratamiento respiratorio e inotrópico si fuera necesario), así como tratamiento antiinflamatorio con corticoides e inmunoglobulinas endovenosas. En casos de enfermedad refractaria se puede intensificar el tratamiento con megabulus de corticoides, así como administrar tratamientos biológicos como bloqueantes de IL-1 (Anakinra) o de TNF (Infliximab). Por otro lado, en ciertas ocasiones estos pacientes reciben tratamiento con aspirina (que se mantiene hasta la normalización de la cifra de plaquetas y confirmar que no hay alteraciones en las arterias coronarias), heparina de bajo peso molecular (profilaxis de trombosis), así como antibioterapia (que se usa en muchas ocasiones para tratar una potencial sepsis, cuando existen dudas en el diagnóstico diferencial a la espera de resultados de los cultivos) (149,150).

2. HIPÓTESIS

Se plantean dos hipótesis principales:

En relación con la clínica del Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2), se hipotetiza que la mayoría de los pacientes pediátricos infectados por SARS-CoV-2 que consultan a un centro hospitalario presentarán formas de enfermedad leve, o incluso presentarán la infección de forma concomitante a otra enfermedad que verdaderamente cause los síntomas motivo de consulta. La neumonía por SARS-CoV-2 será uno de los fenotipos de presentación de enfermedad grave de la población pediátrica, pudiendo requerir ingreso, especialmente en niños/as con factores de riesgo, de forma similar a los adultos. Otro fenotipo de presentación grave de la infección por SARS-CoV-2, relacionado con ingreso incluso en cuidados intensivos, será el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C). El estudio de estos casos graves podrá definir aspectos clínicos y analíticos clave con los que podremos caracterizar los factores de riesgo para su aparición. Además, la comparación del fenotipo del MIS-C con una cohorte de pacientes sépticos en cuidados intensivos permitirá definir una escala diagnóstica que nos ayude a diferenciar mejor entre ambas patologías.

En relación con la transmisión del SARS-CoV-2, se hipotetiza que en los entornos deportivos la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 será similar a la de los entornos escolares. La realización de deportes al aire libre podrá ser beneficiosa con respecto a los entornos cerrados en cuanto a la menor transmisión de la infección. La utilización de la saliva como método diagnóstico del SARS-CoV-2 será equiparable a las muestras nasofaríngeas y de sangre, y será especialmente útil en la población pediátrica al ser menos invasiva.

3. OBJETIVOS

De acuerdo con las hipótesis descritas, los objetivos definidos en esta tesis doctoral son:

1. Caracterizar los distintos fenotipos clínicos de la infección por Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) en los pacientes pediátricos que requieren atención hospitalaria.
 - 1.1. Determinar los factores de riesgo de hospitalización en la edad pediátrica.
 - 1.2. Describir los cuadros clínicos más graves: la neumonía/síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C).
 - 1.3. Analizar el patrón de fiebre e inflamación que presentan los pacientes pediátricos con MIS-C y compararlo con otras entidades inflamatorias similares como la sepsis.
 - 1.4. Diseñar una escala diagnóstica que distinga al ingreso a los pacientes con sospecha de MIS-C de los pacientes con sospecha de sepsis.
2. Analizar la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos dentro de cohortes controladas.
 - 2.1. Estudiar la transmisión durante la realización de actividades deportivas.
 - 2.2. Evaluar la utilidad de la saliva como muestra para el estudio serológico de la transmisión del SARS-CoV-2, en comparación con suero/plasma (técnica *gold-standard*).

4. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

4.1. Primer estudio

El primer estudio responde a los siguientes objetivos:

1. Caracterizar los distintos fenotipos clínicos de la infección por SARS-CoV-2 en los pacientes pediátricos que requieren atención hospitalaria.
 - 1.1. Determinar los factores de riesgo de hospitalización en la edad pediátrica.

Solito C, Hernández-García M, Arguedas Casamayor N, Pavón Ortiz A, Pino R, Alsina L, F. de Sevilla M. Ingresos COVID-19: intentando comprender el impacto real de la infección en pacientes hospitalizados. *Anales de Pediatría*. Marzo 2024. Article in press. doi: 10.1016/j.anpedi.2024.02.016.

Resumen:

Introducción: Varios estudios han sugerido que la tasa de hospitalización por COVID-19 en niños y adolescentes puede reflejar la prevalencia de la infección más que la gravedad de la enfermedad.

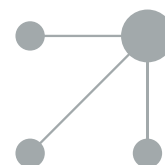
Objetivo: Describir las características clínicas de los pacientes pediátricos hospitalizados con infección por SARS-CoV-2, con el fin de comprender si éste fue el verdadero motivo de ingreso.

Material y métodos: Estudio de cohortes retrospectivo que incluyó a pacientes de 0 a 18 años con infección por SARS-CoV-2 o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2 (SIM-PedS), ingresados en un hospital infantil de tercer nivel en España entre el 1 de enero de 2020 y el 31 de diciembre de 2021.

Resultados: El estudio incluyó 228 pacientes. 150 fueron ingresos causados por la COVID-19 (la infección por SARS-CoV-2 fue la principal causa de hospitalización) y 78 fueron ingresos no causados por la COVID-19 (ingresaron por otro motivo, pero de forma concomitante cursaron la infección por SARS-CoV-2 de forma asintomática o paucisintomática, detectada en el screening universal al ingreso).

Entre los pacientes ingresados por la COVID-19, 59 (39.3%) tenían comorbilidades. 49 (32.6%) pacientes fueron diagnosticados de enfermedad respiratoria aguda (neumonía, broncoespasmo o bronquiolitis), la forma de presentación de la COVID-19 más frecuente. 27 (18%) pacientes fueron diagnosticados de SIM-PedS; este diagnóstico se observó con más frecuencia durante el primer año de la pandemia (variante predominante Wild Type). El 80% de los pacientes con enfermedad respiratoria aguda necesitaron algún tipo de soporte respiratorio, principalmente oxígeno de bajo flujo. 24 (16%) pacientes requirieron ingreso en UCI, de los cuales más de la mitad fueron SIM-PedS. La gravedad de la enfermedad fue similar con todas las variantes del virus. Dos pacientes (ambos con comorbilidades graves) fallecieron por afecciones relacionadas con la COVID-19.

Conclusiones: Un tercio de los pacientes fueron hospitalizados con infección por SARS-CoV-2 pero no a causa de ella. La enfermedad respiratoria aguda tuvo menos incidencia y mejor pronóstico que en la población adulta, mientras que el SIM-PedS fue una causa importante de morbilidad y hospitalización. La mortalidad global fue extremadamente baja.



ORIGINAL

Ingresos COVID-19: intentando comprender el impacto real de la infección en pacientes hospitalizados[☆]

Claudia Solito^{a,1}, María Hernández-García^{a,b,*,1}, Noelia Arguedas Casamayor^a, Alba Pavón Ortiz^a, Rosa Pino^a, Laia Alsina^{c,d,e,f,g} y Mariona Fernández de Sevilla^{a,b,e,h}

^a Servicio de Pediatría, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, España

^b Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas y Microbioma, Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Barcelona, España

^c Grupo de Estudio de Enfermedades por Disfunción Inmune en Pediatría, Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Barcelona, España

^d Unidad de Inmunología Clínica e Inmunodeficiencias Primarias, Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, España

^e Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^f Programa de Inmunología Clínica, Hospital Sant Joan de Déu-Hospital Clínic, Barcelona, España

^g Plataforma de Terapias Avanzadas, Hospital Sant Joan de Déu-Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^h Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBER-ESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

Recibido el 24 de octubre de 2023; aceptado el 8 de febrero de 2024

PALABRAS CLAVE

COVID-19;
Ingresos;
Infecciones
asintomáticas;
SIM-PedS

Resumen

Introducción y objetivo: Varios estudios han sugerido que la tasa de hospitalización por COVID-19 en niños y adolescentes puede reflejar la prevalencia de la infección más que la gravedad de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue describir las características clínicas de pacientes pediátricos hospitalizados con infección por SARS-CoV-2, con el fin de comprender si este fue el principal motivo de ingreso.

Métodos: Estudio de cohortes retrospectivo que incluyó a pacientes de cero a 18 años con infección por SARS-CoV-2 o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2 (SIM-PedS), ingresados en un hospital infantil de tercer nivel en España entre el primero de enero de 2020 y el 31 de diciembre de 2021.

[☆] Presentación previa: Estudio presentado en la VII Reunión Anual de la Sociedad Española de Pediatría Interna Hospitalaria (SEPIH), 21-22 de octubre, 2022, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, España.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: maria.hernandezg@sjd.es (M. Hernández-García).

¹ Estos autores contribuyeron por igual y comparten la primera autoría.

<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2024.02.016>

1695-4033/© 2024 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: C. Solito, M. Hernández-García, N. Arguedas Casamayor et al., Ingresos COVID-19: intentando comprender el impacto real de la infección en pacientes hospitalizados, Anales de Pediatría, <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2024.02.016>

Resultados: Se incluyeron 228 pacientes, de los cuales 150 fueron ingresos causados por COVID (infección por SARS-CoV-2 como principal causa de hospitalización) y 78 fueron ingresos no causados por COVID (infección por SARS-CoV-2 no relacionada con la hospitalización). Entre los ingresos causados por COVID, 58 pacientes tenían comorbilidades; 49 cursaron con enfermedad respiratoria aguda (neumonía, broncoespasmo o bronquiolitis); y 27 fueron diagnosticados de SIM-PedS; este diagnóstico se observó con más frecuencia durante el primer año de la pandemia (variante *wild type*). El 80% de los pacientes con enfermedad respiratoria aguda necesitaron algún tipo de soporte respiratorio, principalmente oxígeno de bajo flujo (OBF). La gravedad de la enfermedad fue similar con todas las variantes del virus. Dos pacientes (ambos con comorbilidades graves) fallecieron por afecciones relacionadas con la COVID-19.

Conclusiones: En nuestro estudio, un tercio de los pacientes fueron hospitalizados con infección por SARS-CoV-2 pero no a causa de ella. La enfermedad respiratoria aguda tuvo menos incidencia y mejor pronóstico que en la población adulta, mientras que el SIM-PedS fue una causa importante de morbilidad y hospitalización. La mortalidad fue extremadamente baja.

© 2024 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

COVID-19;
Patient admission;
Asymptomatic
infections;
MIS-C

COVID-19 Admissions: trying to define the real impact of infection in hospitalized patients

Abstract

Introduction and objective: Several studies have suggested that the hospitalization rate for COVID-19 in children and adolescents may reflect the prevalence of the infection rather than the severity of the disease. The aim of this study was to describe the clinical features of hospitalised paediatric patients with SARS-CoV-2 infection in order to understand if the infection was the reason for admission.

Methods: Retrospective cohort study including patients aged 0 to 18 years with SARS-CoV-2 infection or multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) admitted to a tertiary care children's hospital in Spain between 01/01/2020 and 12/31/2021.

Results: 228 patients were included, corresponding to 150 cases of COVID-related admission (SARS-CoV-2 infection as main cause of hospitalization) and 78 of non-COVID-related admission (SARS-CoV-2 infection unrelated to the hospitalization).

In the group of COVID-related admissions, 58 patients had comorbidities. Forty-nine patients had acute respiratory disease (pneumonia, bronchospasm or bronchiolitis). Multisystem inflammatory syndrome in children was diagnosed in 27 and was significantly more frequent in the first year of the pandemic (wild type virus). Eighty percent of patients with acute respiratory disease needed respiratory support, mostly low-flow oxygen therapy. The severity of the disease was similar in all virus variants. Two patients (both with severe comorbidities) died from COVID-related conditions.

Conclusions: In our study, one third of the patients were admitted with SARS-CoV-2 infection but not because of it. Acute respiratory disease was less frequent and had a better prognosis compared to the adult population, while MIS-C was a major cause of morbidity and hospitalization. The fatality rate was extremely low.

© 2024 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Varios estudios han sugerido que la infección por SARS-CoV-2 en la población pediátrica es menos prevalente y menos contagiosa que en los adultos. Su gravedad también parece ser menor en los niños, con un mayor porcentaje de casos asintomáticos y leves¹⁻⁴. Las formas graves agudas del COVID-19 que se han descrito han resultado ser más comunes en adolescentes y pacientes con comorbilidades⁵⁻⁸. Por otro lado, el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico

vinculado a SARS-CoV-2 (SIM-PedS) se ha descrito como una causa importante de ingreso hospitalario y mortalidad⁹⁻¹².

En general, las tasas de hospitalización pediátricas durante la pandemia fueron bajas en los países occidentales^{2,3,8,13,14}, con excepción de un aumento durante la ola de ómicron (variante B.1.1.529). En Estados Unidos, a principios de 2022, la tasa de hospitalización por COVID-19 en niños de cero a cuatro años llegó a quintuplicarse en comparación con los casos reportados en los meses anteriores. Estos datos causaron preocupación sobre el posible impacto

de las nuevas variantes en la población pediátrica, aunque también se justificaban por el hecho de que este grupo etario era el único en el que la vacunación todavía no estaba autorizada en aquel momento¹⁵. En España, la primera campaña de vacunación frente a SARS-CoV-2 en la población de 16 a 29 años comenzó el 30 de junio de 2021. La campaña de vacunación para niños de 12 a 15 años comenzó el 4 de agosto de 2021, y la de niños de cinco a 11 años el 15 de diciembre de 2021.

Debido al cribado universal de infección por SARS-CoV-2 llevado a cabo en todos los pacientes ingresados, algunos investigadores han sugerido que la tasa de hospitalización en pacientes pediátricos podría reflejar la prevalencia de la infección más que la gravedad de la enfermedad. Esto podría llevar a sobreestimar el número de casos que realmente requieren ingreso hospitalario¹⁴.

El objetivo de este estudio fue describir las características clínicas de pacientes pediátricos hospitalizados con infección por SARS-CoV-2 confirmada durante los primeros dos años de la pandemia con objeto de esclarecer si este fue el principal motivo de ingreso. Una mayor comprensión del impacto del COVID-19 en pediatría podría ser útil para evaluar las estrategias de salud pública.

Pacientes y métodos

Sujetos y entorno de estudio

Estudio de cohortes retrospectivo en pacientes de cero a 18 años de edad diagnosticados de infección aguda por SARS-CoV-2 o SIM-PedS ingresados entre el primero de enero de 2020 y el 31 de diciembre de 2021 en un hospital infantil terciario en España.

El diagnóstico de infección aguda se basó en la detección de ARN de SARS-CoV-2 por medio de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) en muestras de hisopado o aspirado nasofaríngeo (ANF) o saliva o en la detección de antígeno de SARS-CoV-2 en ANF, de acuerdo con el protocolo del centro en el momento del ingreso. El diagnóstico de SIM-PedS se realizó aplicando los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que además de antecedentes y hallazgos de laboratorio compatibles requiere evidencia de antecedente de infección por SARS-CoV-2 (confirmada por RT-PCR, prueba de antígenos o serología positiva con detección de anticuerpos contra la proteína S de SARS-CoV-2 (Abbott) o antecedente conocido de contacto con un paciente con COVID-19¹⁰.

Se excluyeron a los pacientes reingresados en menos de 90 días con RT-PCR positiva por el prolongado tiempo de excreción viral conocido para el virus, con excepción de los pacientes inmunocomprometidos reingresados con síntomas respiratorios y una prueba de antígenos positiva, que se consideraron casos de infección aguda¹⁶⁻¹⁸.

Es importante tener en cuenta que tanto los criterios para realizar pruebas de detección de SARS-CoV-2 como los métodos diagnósticos utilizados variaron considerablemente durante el periodo de estudio. Al principio de la pandemia, debido a la escasez de los tests, la prueba de RT-PCR solo se utilizaba en pacientes con sospecha de infección^{19,20}. Desde junio de 2020, se llevó a cabo el cribado universal en

todos los pacientes ingresados (incluyendo a los ingresados en la unidad de psiquiatría infantil y adolescente). Una vez se autorizaron las pruebas rápidas de antígenos (laboratorios Roche), se realizaron en pacientes mayores de un año con síntomas respiratorios de cinco a 10 días de evolución, utilizándose la prueba RT-PCR en el resto de los pacientes.

Variables

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes seleccionados para obtener información sobre enfermedades subyacentes, el curso de la enfermedad, los hallazgos radiológicos, de laboratorio y microbiológicos, el tratamiento recibido y la evolución.

Los casos se clasificaron como: COVID-19 como motivo del ingreso (ingresos causados por COVID) y COVID-19 como infección en el momento del ingreso no relacionada con la hospitalización (ingresos no causados por COVID).

Los casos en los que el SARS-CoV-2 fue el motivo principal del ingreso (causa directa) o en los que se consideró que el paciente no habría necesitado ser ingresado de no haber sido por la infección (causa indirecta) se clasificaron como ingresos causados por COVID. Esto incluiría las infecciones respiratorias agudas (bronquiolitis, broncoespasmo, neumonía), el SIM-PedS, el ingreso para observación en pacientes con riesgo y los lactantes febriles con neutropenia en los que no se detectó ninguna otra infección. El fenotipo clínico de los pacientes con ingresos causados por COVID se comparó en distintos periodos basados en las variantes predominantes (> 50% de las muestras aleatorias) en nuestro entorno: variante silvestre o *wild type* (marzo 2020-enero 2021), alfa (febrero 2021-mayo 2021), delta (junio 2021-noviembre 2021) y ómicron (diciembre 2021-abril 2022)^{21,22}. Hemos de resaltar que el periodo de estudio terminó el 31 de diciembre, justo al comenzar la ola de ómicron.

Por otro lado, los pacientes hospitalizados por otros motivos con resultados positivos en el cribado de SARS-CoV-2 al ingreso se consideraron ingresos no causados por COVID. Los casos inciertos se debatieron entre los investigadores hasta alcanzar un consenso.

Con respecto a las coinfecciones, en los niños de cero a cuatro años de edad con síntomas respiratorios se realizaron pruebas para la detección del virus respiratorio sincitial (VRS) e influenza A/B durante la temporada epidémica, además del cribado de SARS-CoV-2, en muestras de hisopado o ANF (ensayo Xpert® Xpress CoV-2/Flu/RSV plus-Respiratory [Cepheid, Sunnyvale, CA, USA] o Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV [Seegene Inc, Seoul, South Korea]). También se realizaron pruebas de RT-PCR para múltiples virus respiratorios (panel BIOFIRE Respiratory 2.1 plus [RP2.1 plus] [Biomerieux, Marcy l'Etoile, France] o panel QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 [Qiagen, Hilden, Germany]) en muestras de ANF o aspirado traqueal, así como cultivos, en todos los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) por complicaciones respiratorias y en determinados pacientes con comorbilidades respiratorias.

Se realizó hemocultivo en casos de sepsis o fiebre con empeoramiento del estado general.

En lo concerniente al tratamiento específico para el COVID-19 se debe tener en cuenta que las guías variaron considerablemente a lo largo del periodo bajo estudio.

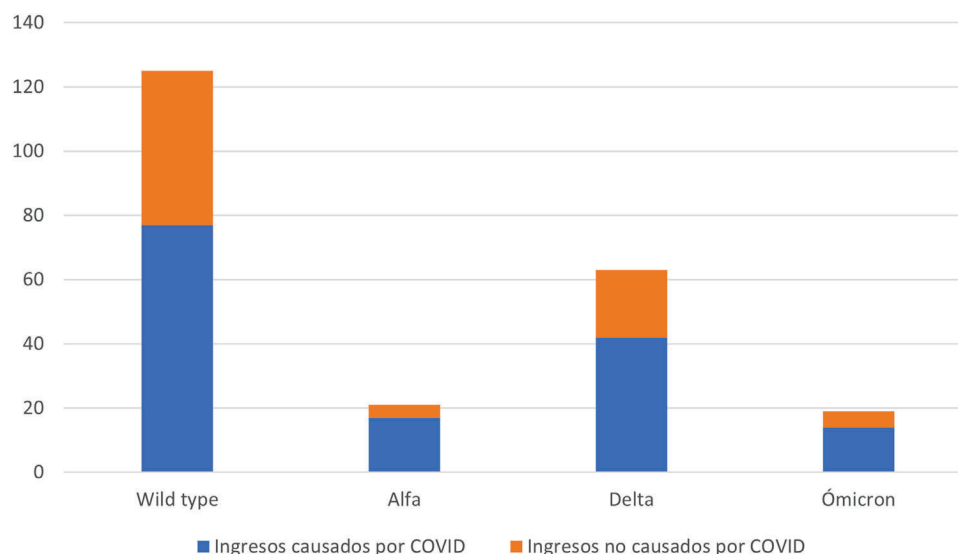


Figura 1 Pacientes ingresados y variantes predominantes de SARS-CoV-2.

Todos los pacientes de alto riesgo ingresados para observación, con diagnóstico de enfermedad respiratoria aguda o SIM-PedS o ingresados en la UCIP, permanecieron en seguimiento en consultas externas del hospital durante un mínimo de tres meses tras el ingreso. El resto de los pacientes fueron derivados al pediatra de atención primaria.

Análisis estadístico y consideraciones éticas

Se calcularon estadísticos descriptivos, expresando los resultados como media y rango intercuartílico (IQR) o como proporciones, según correspondiese. Las variables categóricas se compararon con las pruebas de χ^2 y f de Fisher, y los valores p inferiores a 0,05 se consideraron indicativos de diferencias estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* Stata, versión 15.1 (StataCorp LLC. Texas, USA).

El estudio se llevó a cabo en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético institucional (PIC-90-22). Teniendo en cuenta el gran número de pacientes esperable en la muestra y la naturaleza no experimental del estudio, el comité aprobó la exención de consentimiento informado. Los datos de los pacientes se registraron en una base de datos localizada en una carpeta protegida en la intranet del hospital y fueron codificados por profesionales externos al grupo de investigación para salvaguardar la confidencialidad de los pacientes.

Resultados

Durante el periodo de estudio, 201 pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2 y 27 con SIM-PedS fueron ingresados en el hospital. De este total, 129 (56%) eran varones.

Se clasificó a 150 pacientes (66%) como ingresos causados por COVID y a 78 (34%) como ingresos no causados por COVID. La edad mediana en estos grupos fue de seis años (IQR: 0,1-13,9) y ocho años (IQR: 0,6-14,5), respectivamente.

Debido al calendario de vacunación frente a SARS-CoV-2, solo cuatro de los pacientes en la muestra habían

completado la pauta de dos dosis de vacuna antes del ingreso.

La [figura 1](#) muestra el número de ingresos causados por COVID y no causados por COVID en relación con la variante predominante de SARS-CoV-2.

Ingresos causados por COVID

En el grupo de ingresos causados por COVID, 58 pacientes (39%) tenían una o más comorbilidades. Las más frecuentes fueron el asma, la obesidad, las enfermedades neurológicas, las enfermedades pulmonares y las inmunodeficiencias ([tabla 1](#)).

El diagnóstico más frecuente al alta fue la neumonía (23%), seguida de síndrome febril en lactante menor de tres meses (21%), SIM-PedS (18%) e ingreso para observación en pacientes de alto riesgo (13%) ([tabla 1](#)).

El SIM-PedS se observó con mayor frecuencia en la ola de la variante *wild type* de SARS-CoV-2, mientras que la enfermedad respiratoria aguda y otros diagnósticos (incluyendo las manifestaciones gastrointestinales) se observaron con mayor frecuencia en la ola de la variante delta ([fig. 2](#)). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,012$) ([tabla 2](#)).

De los 150 pacientes con ingresos causados por COVID, 24 (16%) tuvieron que ser ingresados en la UCIP: 13 (54%) con SIM-PedS por necesitar soporte vasoactivo, 10 (42%) con enfermedad respiratoria aguda por necesitar soporte respiratorio más agresivo y uno (4%) con encefalitis por requerir observación y monitorización estrictas.

El porcentaje de pacientes que requirieron ingreso en la UCIP fue del 20% ($n = 10$) en el grupo con enfermedad respiratoria aguda y del 48% ($n = 13$) en el grupo con SIM-PedS.

Se clasificaron 123 casos según el nivel de gravedad (excluyendo los 27 de SIM-PedS del total de 150 para evitar sesgos que pudieran llevar a sobreestimar la gravedad). Se clasificaron 83 casos (68%) como leves (sin necesidad de soporte respiratorio), 27 (22%) como moderados (necesidad de oxígeno de bajo flujo [OBF]), cuatro (3%) como graves

Tabla 1 Comorbilidades y diagnósticos al alta en pacientes con ingresos causados por COVID

Ingresos causados por COVID (n = 150)	
Comorbilidades	n (%)
<i>Otra enfermedad neurológica</i>	14 (9%)
<i>Asma</i>	12 (8%)
<i>Obesidad/Sobrepeso</i>	12 (8%)
<i>Otra enfermedad pulmonar</i>	8 (5,3%)
Apnea del sueño	3 (2%)
Bronquiectasia	2 (1,3%)
Síndrome aspirativo crónico secundario a enfermedad neurológica	2 (1,3%)
Displasia broncopulmonar	1 (0,6%)
<i>Inmunodeficiencia</i>	8 (5,3%)
Secundaria	5 (3,3%)
Primaria (syndrome mielodisplásico)	1 (0,6%)
Primaria (deficiencia de MyD88)	1 (0,6%)
Primaria (asplenia congénita)	1 (0,6%)
<i>Sibilantes recurrentes</i>	5 (3,3%)
<i>Parálisis cerebral</i>	4 (2,6%)
<i>Cardiopatía congénita</i>	4 (2,6%)
<i>Otra enfermedad metabólica</i>	4 (2,6%)
Aciduria glutárica tipo 1	2 (1,3%)
Hipotiroidismo	1 (0,6%)
Déficit de OTC (ornitina carbamil transferasa)	1 (0,6%)
<i>Prematuridad ≤ 34 semanas de gestación</i>	3 (2%)
<i>Nefropatía</i>	3 (2%)
<i>Enfermedad neuromuscular</i>	2 (1,3%)
<i>Síndrome de Down</i>	2 (1,3%)
<i>Diabetes mellitus</i>	2 (1,3%)
<i>Anemia de células falciformes</i>	2 (1,3%)
<i>Otras enfermedades</i>	29 (19%)
Ingresos causados por COVID (n = 150)	
Diagnóstico al alta	n (%)
<i>Neumonía</i>	34 (23%)
<i>Lactante febril menor de 3 meses</i>	32 (21%)
<i>SIM-PedS</i>	27 (18%)
<i>Ingreso para observación de paciente de alto riesgo</i>	20 (13%)
<i>Bronquiolitis</i>	6 (4%)
<i>Broncoespasmo</i>	6 (4%)
<i>Neutropenia febril</i>	6 (4%)
<i>Clínica gastrointestinal con necesidad de rehidratación endovenosa</i>	6 (4%)
<i>Bronconeumonía</i>	3 (2%)
<i>Otros diagnósticos:</i>	10 (7%)
Hiporexia	2 (1,3%)
<i>Status epilepticus</i>	1 (0,6%)
Apnea neonatal	1 (0,6%)
Crup	1 (0,6%)
Disnea (sin neumonía)	1 (0,6%)
Descompensación de cardiopatía congénita	1 (0,6%)
Hepatitis colestásica (en paciente con enfermedad metabólica)	1 (0,6%)
Encefalitis	1 (0,6%)
Trombocitopenia (exacerbación de trombocitopenia immune crónica)	1 (0,6%)

EG: edad gestacional; SIM-PedS: síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2; OTC: ornitina carbamil transferasa.

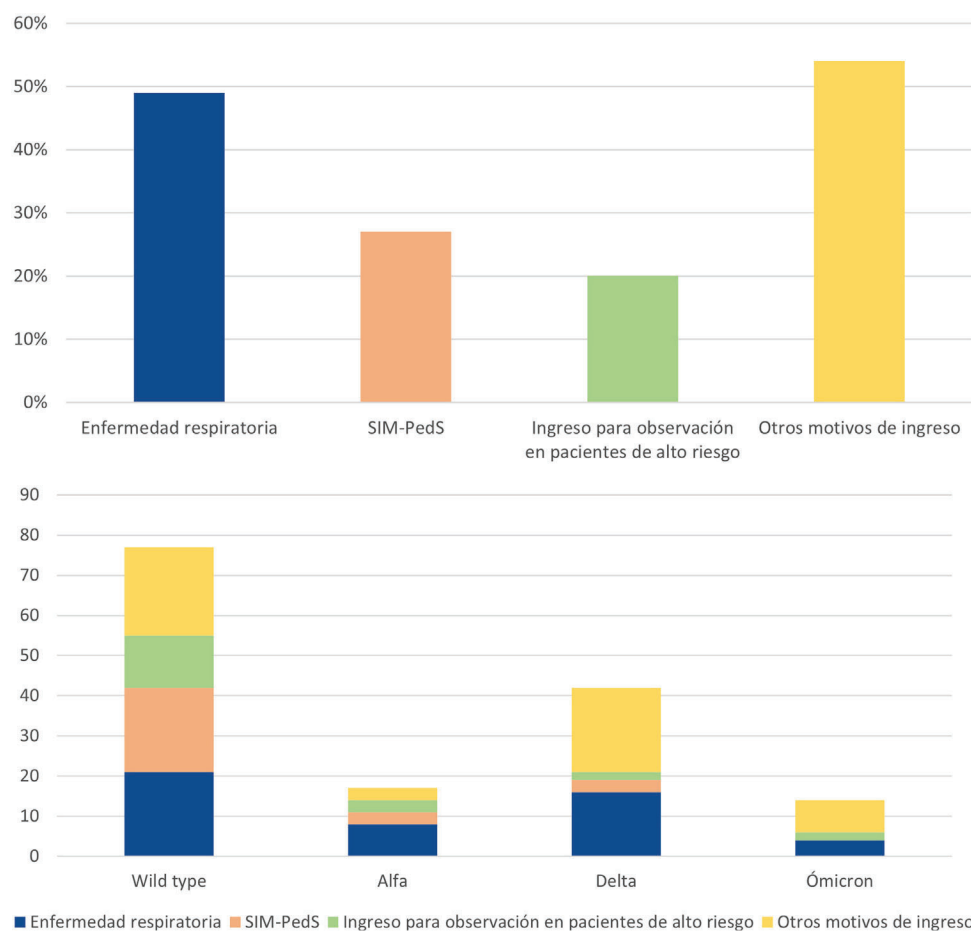


Figura 2 (2.1 y 2.2). Diagnóstico al alta en los ingresos causados por COVID, según el grupo de pacientes y la variante del virus.

Tabla 2 Diagnóstico al alta en ingresos causados por COVID, por grupo de pacientes y variante

	Enfermedad respiratoria aguda	SIM-PedS	Ingreso para observación	Otros motivos de ingreso	Total
Wild type	21	21	13	22	77
Alfa	8	3	3	3	17
Delta	16	2	2	21	42
Ómicron	4	0*	2	8	14
Pearson					
$\chi^2_{(9)} = 21,2491$					
$p = 0,012$					

* No se registraron casos de SIM-PedS durante la ola de ómicron debido a los límites del periodo de estudio.

SIM-PedS: síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2.

(necesidad de oxígeno de alto flujo [OAF]) y nueve (7%) como críticos (necesidad de ventilación no invasiva [VNI] o ventilación mecánica [VM]).

El análisis por separado de los 49 pacientes con enfermedad respiratoria aguda reveló que 39 (79%) necesitaron algún tipo de soporte respiratorio, principalmente OBF (fig. 3). La gravedad de la enfermedad no varió significativamente entre los periodos correspondientes a las distintas variantes, aunque los cuatro pacientes con enfermedad respiratoria aguda durante la ola de ómicron solo recibieron OBF.

Ninguno de los pacientes en el estudio requirió oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO).

La información sobre el tratamiento específico frente al COVID-19 se presenta en la [tabla 3](#).

Los datos sobre la coinfección se presentan en la [tabla 4](#). Se detectó coinfección bacteriana en tres casos y viral en otros seis casos; entre estos últimos, el patógeno detectado con mayor frecuencia fue rinovirus/enterovirus. Cinco pacientes (el 83% de aquellos con coinfección viral) necesitaron algún tipo de soporte respiratorio, y dos de ellos (33%) requirieron ingreso en la UCIP y VNI/VM. No hubo dife-

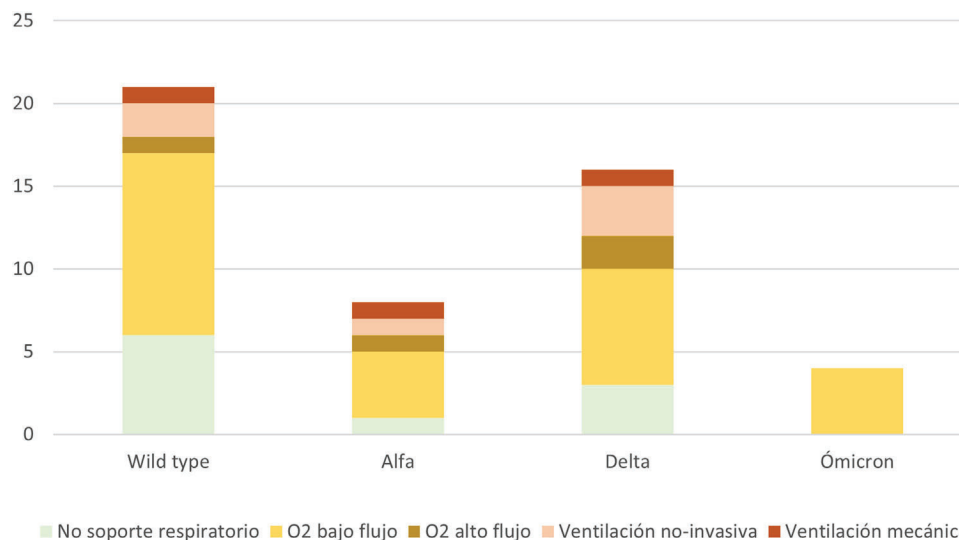


Figura 3 Soporte respiratorio requerido por los pacientes con enfermedad respiratoria asociada a COVID según la variante del virus.

Tabla 3 Tratamiento específico frente al COVID en pacientes con ingresos causados por COVID

Tratamiento	n (%)
Corticosteroides	51 (34%)
Heparina	41 (27%)
Inmunoglobulinas intravenosas	26 (17%)
Azitromicina	11 (7%)
Remdesivir	4 (2,6%)
Tocilizumab	4 (2,6%)
Tocilizumab + otros anticuerpos monoclonales (siltuximab, anakinra)	1 (0,6%)

rencias estadísticamente significativas en la gravedad de la enfermedad (necesidad de soporte respiratorio o ingreso en la UCIP).

Dos pacientes fallecieron por patologías relacionadas con el COVID, ambos con múltiples comorbilidades. El primero era un niño de 12 años con leucemia linfoblástica aguda que había recibido tratamiento con terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) y con antecedente de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos complicado por enfermedad injerto contra huésped. El segundo era un niño de ocho años con

antecedentes de prematuridad extrema, parálisis cerebral grave, epilepsia e infecciones respiratorias recurrentes.

Un paciente reportó síntomas persistentes de COVID-19 (COVID persistente o *long COVID*) durante el seguimiento. Era un adolescente de 14 años que había sido ingresado en la UCIP por SIM-PedS y describió fatiga y mareos que persistían a los seis meses del ingreso.

Tres pacientes desarrollaron secuelas a largo plazo: uno disfunción neurológica a largo plazo secundaria a encefalitis, y los otros dos aneurismas coronarios tras haber desarrollado SIM-PedS.

Por último, cabe mencionar que dos pacientes tuvieron antecedentes de infección previa por SARS-CoV-2, aunque había sido leve y no había requerido ingreso hospitalario.

Ingresos no causados por COVID

En nuestro estudio, 78 (34%) pacientes fueron clasificados como ingresos no causados por COVID. La [tabla 5](#) detalla los diagnósticos que motivaron sus ingresos. En la mayoría de estos pacientes, la infección por SARS-CoV-2 fue completamente asintomática y solo 26 (33%) fueron oligosintomáticos (síntomas catarrales leves). Ninguno requirió soporte respiratorio de ningún tipo.

Tabla 4 Coinfecciones bacterianas y virales en pacientes con ingresos causados por COVID

Microorganismo	Tipo de muestra	n (%)
Coinfección bacteriana		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Aspirado traqueal (cultivo)	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urocultivo	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	Hemocultivo	1
Coinfección viral		
VRS	ANF	2
Rino/enterovirus	ANF	3
Rino/enterovirus, influenza B, parainfluenza	LBA	1

ANF: aspirado nasofaríngeo; LBA: lavado broncoalveolar; VRS: virus respiratorio sincitial.

Tabla 5 Diagnóstico al alta en ingresos no causados por COVID

Ingresos no causados por COVID (n = 78)	
Diagnóstico	n (%)
Infección del tracto urinario	12 (15%)
Trastorno psiquiátrico	11 (14%)
Apendicitis	8 (10%)
Otros motivos quirúrgicos	8 (10%)
Fractura o traumatismo	6 (8%)
Infección dental o cutánea	6 (8%)
Enfermedad hematooloncológica	4 (5%)
Diabetes mellitus	2 (3%)
Recién nacido de madre con resultado positivo para SARS-CoV-2	2 (3%)
Otros diagnósticos	19 (24%)

Discusión

Comparación de ingresos causados y no causados por COVID

De todos los pacientes pediátricos ingresados con infección por SARS-CoV-2 durante el periodo de estudio, el 34% no fueron hospitalizados a causa del COVID, ni directa ni indirectamente, lo que sugiere que es muy probable que la tasa de hospitalización por infección por SARS-CoV-2 en la población pediátrica se haya sobreestimado. Otros autores han analizado este aspecto anteriormente, como Kushner et al.¹⁴, en cuyo estudio se estimó que el 45% de los ingresos probablemente no habían sido causados por el SARS-CoV-2. Este porcentaje es ligeramente mayor que el encontrado en nuestro estudio.

Es importante desagregar y analizar estos dos grupos para definir correctamente el impacto de la enfermedad en la población pediátrica. Los casos considerados ingresos causados por COVID se clasificaron así porque la infección fue el motivo primario del ingreso, pero la mayoría de estos pacientes no desarrollaron COVID grave. Tal fue el caso, por ejemplo, de pacientes con sintomatología leve pero que tenían enfermedades subyacentes (pacientes de alto riesgo) ingresados para mantenerse en observación y recibir tratamiento preventivo con remdesivir o de lactantes febriles menores de tres meses en los que no se detectó ninguna infección aparte de la de SARS-CoV-2. Este último caso supone un reto para los facultativos tanto de Atención Primaria como de Urgencias, y se han propuesto algoritmos para mejorar la evaluación del riesgo de infección bacteriana en estos pacientes²³.

Características clínicas de los ingresos causados por COVID

Al contrario que en los adultos, solo un tercio de los ingresos causados por COVID en pacientes pediátricos fueron por enfermedad respiratoria aguda, en los que además revistió menor gravedad²⁴⁻²⁷. Cabe destacar que, en este subgrupo de pacientes, la neumonía fue el diagnóstico más frecuente al alta (34 pacientes; 23%), mientras que solo seis (4%)

recibieron diagnóstico de bronquiolitis, seis (4%) de broncoespasmo y otros tres (2%) de bronconeumonía al alta. Esto corrobora los hallazgos de estudios previos sobre la incidencia extremadamente baja de bronquiolitis en lactantes con infección por SARS-CoV-2^{1,28}. La neumonía fue más frecuente en los adolescentes, como ya se había descrito previamente tanto en la literatura científica como en una revisión de casos realizada en nuestro hospital²⁹.

En nuestro estudio, el SIM-PedS fue una causa importante de ingreso relacionado con el COVID, una presentación de la enfermedad que, a pesar de no ser aguda, se asocia con la mayor gravedad y morbilidad en la población pediátrica^{11,12,30}. El porcentaje de pacientes que requirió ingreso en la UCIP fue superior en aquellos con SIM-PedS en comparación con los que tenían enfermedad respiratoria aguda. Estos resultados fueron consistentes con los descritos en la cohorte española descrita por el grupo de trabajo EPICO de la Asociación Española de Pediatría (AEP)⁹.

La tasa de letalidad fue del 4% en los pacientes con enfermedad respiratoria aguda y del 0,9% respecto a todos los pacientes del estudio, resultados similares a los descritos en la literatura^{2,4,31}. La presencia de comorbilidades subyacentes se relaciona directamente con un aumento en la mortalidad en pacientes pediátricos³². En nuestro estudio, los dos pacientes que fallecieron por COVID-19 tenían comorbilidades graves.

Cambios en la semiología clínica durante la pandemia

En nuestro estudio, como ya se ha descrito previamente^{22,33}, el SIM-PedS fue más frecuente durante el periodo en el que predominaba la variante *wild-type* del virus, mientras que la enfermedad respiratoria aguda y otras presentaciones (incluyendo la sintomatología gastrointestinal) fueron más frecuentes durante la ola de delta, diferencias que fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la gravedad, múltiples estudios sugieren que la variante ómicron se asocia a una evolución más leve^{24,34}. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la gravedad entre los distintos periodos, probablemente debido al reducido número de pacientes incluidos durante la ola de ómicron.

En cualquier caso, los resultados obtenidos son similares a los de estudios previos^{13,14,31}, lo que indica que pueden ser representativos del impacto real del SARS-CoV-2 en la población pediátrica de los países occidentales.

En lo concerniente a los dos pacientes en los que se produjo reinfección, cabe suponer (aunque no se pudo demostrar de manera concluyente en el estudio) que cada variante de SARS-CoV-2 se asocia a un nivel distinto de gravedad y, además, que la inmunidad resultante de la infección no garantiza una protección al 100% frente a la reinfección, que además podría ser más grave.

Coinfecciones

En el presente estudio, la coinfección con VRS fue poco común. En un estudio retrospectivo realizado en 32 lactantes menores de 24 meses ingresados con compromiso respiratorio por COVID-19 se encontró que el 18,7% tenían coinfección

por VRS³⁵. Nosotros encontramos una incidencia muy inferior de coinfección, aunque es posible que se infraestimara la incidencia real porque la prueba no se realizó en todos los pacientes. Aun así, es probable que la coinfección por SARS-CoV-2 y VRS fuera infrecuente. A este respecto, también se ha descrito que la pandemia de COVID-19 ha afectado a la epidemiología de la bronquiolitis aguda, con una disminución considerable en la incidencia de bronquiolitis causada por el VRS en comparación con años anteriores³⁶. Sería interesante analizar los cambios epidemiológicos en todas las enfermedades respiratorias que requieren ingreso hospitalario, comparando lo observado durante la pandemia con los años precedentes.

Limitaciones

Nuestro estudio se encuentra limitado por su diseño retrospectivo y unicéntrico. Nuestro hospital es un centro de referencia para muchas enfermedades pediátricas, lo que puede haber dado lugar a sesgos en relación con la prevalencia de comorbilidades, especialmente en pacientes con enfermedades crónicas complejas.

Como ya mencionamos anteriormente, hubo variaciones significativas en los protocolos de cribado y diagnóstico durante el periodo de estudio, lo que puede haber constituido un sesgo importante, especialmente en términos de la posible sobreestimación de la incidencia del COVID-19 grave en los primeros meses del estudio (por la escasez de las pruebas) y la posible infraestimación de las coinfecciones virales en pacientes con enfermedad respiratoria aguda por no haberse hecho de rutina cribado de coinfecciones.

La decisión de incluir ingresos para la observación de pacientes de alto riesgo en el grupo de ingresos causados por COVID, a pesar de que a fin de cuentas no tuvieron un curso grave de enfermedad, puede haber sesgado el impacto percibido de la infección en este grupo.

Como no se realizó seguimiento en el hospital a la totalidad de pacientes incluidos en el estudio (tanto con ingresos causados por COVID como con ingresos no causados por COVID), es posible que se haya infraestimado la frecuencia de los casos de COVID persistente.

Por último, el periodo de estudio (que acabó el 31 de diciembre de 2021) dificulta la evaluación del impacto de la variante ómicron.

Conclusiones

Nuestro estudio confirmó que la significación clínica de la infección por SARS-CoV-2 en la infancia es distinta que en los adultos. En hasta un tercio de los pacientes, la infección por SARS-CoV-2 se diagnosticó exclusivamente por haberse realizado el cribado universal, y la mayoría permanecieron asintomáticos. La tasa de letalidad fue baja y se asoció a la presencia de comorbilidades subyacentes.

Al contrario que en la población adulta, la incidencia de enfermedad respiratoria aguda fue bastante menor y el pronóstico fue generalmente favorable. La neumonía fue más frecuente en los adolescentes. La incidencia de bronquiolitis fue muy baja y la coinfección por VRS infrecuente. Por otro lado, el broncoespasmo asociado a SARS-CoV-2 se observó en niños con antecedentes de sibilancias recurrentes o asma.

El SIM-PedS fue uno de los motivos principales de los ingresos relacionados con el COVID, así como una de las mayores causas de morbilidad.

El fenotipo clínico de las infecciones por SARS-CoV-2 varió en función de la variante predominante, aunque no se detectaron cambios asociados en la gravedad de la enfermedad.

Por último, podemos concluir que es probable que la tasa de hospitalización por infección por SARS-CoV-2 en niños y adolescentes se haya sobreestimado, ya que un tercio de los pacientes en nuestro estudio fueron ingresados «con» COVID, pero no «por» COVID.

Financiación

Este trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A nuestros colegas en el equipo de atención hospitalaria, especialmente Maria Melé-Casas, Gemma Pons-Tomás y Juan José García-García. También estamos en deuda con Carmen Muñoz-Almagro por su contribución desde la perspectiva microbiológica.

Bibliografía

1. Andina-Martinez D, Alonso-Cadenas JA, Cobos-Carrascosa E, Bodegas I, Oltra-Benavent M, Plazaola A, et al. SARS-CoV-2 acute bronchiolitis in hospitalized children: Neither frequent nor more severe. *Pediatr Pulmonol.* 2022;57:57–65.
2. Castagnoli R, Votto M, Licari A, Brambilla I, Bruno R, Perlini S, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Children and Adolescents: A Systematic Review. *JAMA Pediatr.* 2020;174:882–9.
3. Gaythorpe KAM, Bhatia S, Mangal T, Unwin HJT, Imai N, Cuomo-Dannenburg G, et al. Children's role in the COVID-19 pandemic: a systematic review of early surveillance data on susceptibility, severity, and transmissibility. *Sci Rep.* 2021;11:13903.
4. Kim L, Whitaker M, O'Halloran A, Kambhampati A, Chai SJ, Reingold A, et al. Hospitalization Rates and Characteristics of Children Aged <18 Years Hospitalized with Laboratory-Confirmed COVID-19-COVID-NET 14 States, March 1–July 25, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69:1081–8.
5. Campbell JI, Dubois MM, Savage TJ, Hood-Pishchany MI, Sharma TS, Petty CR, et al. Comorbidities Associated with Hospitalization and Progression Among Adolescents with Symptomatic Coronavirus Disease 2019. *J Pediatr.* 2022;245:102–10.e2.
6. Chao JY, Sugarman A, Kimura A, Flamer S, Jing TT, Fernandes DM, et al. Factors Associated With Hospitalization in Children and Adolescents With SARS-CoV-2 Infection. *Clin Pediatr (Phila).* 2022;61:159–67.
7. Graff K, Smith C, Silveira L, Jung S, Curran-Hays S, Jarjour J, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2021;40:e137–45.
8. Uka A, Buettcher M, Bernhard-Stirnermann S, Fougère Y, Mousaoui D, Kottanattu L, et al. Factors associated with hospital and intensive care admission in paediatric SARS-CoV-2 infection: a prospective nationwide observational cohort study. *Eur J Pediatr.* 2022;181:1245–55.

9. Tagarro A, Cobos-Carrascosa E, Villaverde S, Sanz-Santaeufemia FJ, Grasa C, Soriano-Arandes A, et al. Clinical spectrum of COVID-19 and risk factors associated with severity in Spanish children. *Eur J Pediatr.* 2022;181:1105–15.
10. World Health Organization. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19. 2020 [consultado 2 enero 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>.
11. Hoste L, Van Paemel R, Haerynck F. Multisystem inflammatory syndrome in children related to COVID-19: a systematic review. *Eur J Pediatr.* 2021;180:2019–34.
12. Abrams JY, Godfred-Cato SE, Oster ME, Chow EJ, Koumans EH, Bryant B, et al. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: A Systematic Review. *J Pediatr.* 2020;226:45–54.e1.
13. Kim TY, Kim EC, Agudelo AZ, Friedman L. COVID-19 hospitalization rate in children across a private hospital network in the United States: COVID-19 hospitalization rate in children. *Arch Pediatr.* 2021;28:530–2.
14. Kushner LE, Schroeder AR, Kim J, Mathew R. «For COVID» or «With COVID»: Classification of SARS-CoV-2 Hospitalizations in Children. *Hosp Pediatr.* 2021;11:e151–6.
15. Marks KJ, Whitaker M, Agathis NT, Anglin O, Milucky J, Patel K, et al. Hospitalization of Infants and Children Aged 0-4 Years with Laboratory-Confirmed COVID-19-COVID-NET 14 States, March 2020–February 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2022;71:429–36.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2 for Healthcare Providers Testing Individuals in the Community [Internet]. [consultado 8 Ene 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
17. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance on duration of isolation and precautions for adults with COVID-19. [Internet]. [consultado 8 Ene 2023]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/102824>.
18. World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [Internet]. [consultado 8 Ene 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
19. Brotons P, Perez-Argüello A, Launes C, Torrents F, Subirats MP, Saucedo J, et al. Validation and implementation of a direct RT-qPCR method for rapid screening of SARS-CoV-2 infection by using non-invasive saliva samples. *Int J Infect Dis.* 2021;110:363–70.
20. Brotons P, Jordan I, Bassat Q, Henares D, Fernandez de Sevilla M, Ajanovic S, et al. The Positive Rhinovirus/Enterovirus Detection and SARS-CoV-2 Persistence beyond the Acute Infection Phase: An Intra-Household Surveillance Study. *Viruses.* 2021;13:1598.
21. Català M, Cardona PJ, Prats C, Alonso S, Pino D, Alvarez-Lacalle E, et al. Analysis and prediction of COVID-19 for EU-EFTA-UK and other countries. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya; 2021; 80-98. [Internet]. [consultado 11 Jul 2023]. Disponible en: <https://futur.upc.edu/31004321>
22. Pino R, Antoñanzas JM, Paredes-Carmona F, Perramon A, Rivière JG, Coma M, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children and SARS-CoV-2 variants: a two-year ambispective multicentric cohort study in Catalonia, Spain. *Eur J Pediatr.* 2023;182:1897–909.
23. Blázquez-Gamero D, Epalza C, Alonso Cadenas JA, Calleja Gero L, Calvo C, Rodríguez-Molino P, et al., on behalf of EPICO-AEP. Fever without source as the first manifestation of SARS-CoV-2 infection in infants less than 90 days old. *Eur J Pediatr.* 2021;180:2099–106.
24. Relan P, Motaze NV, Kothari K, Askie L, Le Polain O, Van Kerkhove MD, et al. Severity and outcomes of Omicron variant of SARS-CoV-2 compared to Delta variant and severity of Omicron sublineages: a systematic review and metanalysis. *BMJ Glob Health.* 2023;8:e012328.
25. Mantovani A, Rinaldi E, Zusi C, Beatrice G, Saccomani MD, Dalbeni A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children and/or adolescents: a meta-analysis. *Pediatr Res.* 2021;89:733–7.
26. Onder G, Rezza G, Brusaferro S. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA.* 2020;323:1775–6.
27. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting Characteristics Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA.* 2020;323:2052–9.
28. Grimaud E, Challiol M, Guilbaud C, Delestrain C, Madhi F, Ngo J, et al. Delayed acute bronchiolitis in infants hospitalized for COVID-19. *Pediatr Pulmonol.* 2020;55:2211–2.
29. Ríos-Barnés M, Lanaspá M, Noguera-Julian A, Baleta L, De Sevilla MF, Ferri D, et al. The Spectrum of COVID-19 Disease in Adolescents. *Arch Bronconeumol.* 2021;57:84–5.
30. Lee KH, Li H, Lee MH, Park SJ, Kim JS, Han YJ, et al. Clinical characteristics and treatments of multi-system inflammatory syndrome in children: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022;26:3342–50.
31. Woodruff RC, Campbell AP, Taylor CA, Chai SJ, Kawasaki B, Meek J, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatrics.* 2022;149, e2021053418.
32. Kompaniyets L, Agathis NT, Nelson JM, Preston LE, Ko JY, Belay B, et al. Underlying Medical Conditions Associated With Severe COVID-19 Illness Among Children. *JAMA Netw Open.* 2021;4:e2111182.
33. Levy N, Koppel JH, Kaplan O, Yechiam H, Shahar-Nissan K, Cohen NK, et al. Severity and Incidence of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children During 3 SARS-CoV-2 Pandemic Waves in Israel. *JAMA.* 2022;327:2452–4.
34. Bouzid D, Visseaux B, Kassassey C, Daoud A, Fémy F, Hermand C, et al. Comparison of Patients Infected With Delta Versus Omicron COVID-19 Variants Presenting to Paris Emergency Departments. *Ann Intern Med.* 2022;175:831–7.
35. Andrade Alvares P. SARS-CoV-2 and Respiratory Syncytial Virus Coinfection in Hospitalized Pediatric Patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2021;40:e164–6.
36. Guitart C, Bobillo-Perez S, Alejandro C, Armero G, Launes C, Cambra FJ, et al. Bronchiolitis, epidemiological changes during the SARS-CoV-2 pandemic. *BMC Infect Dis.* 2022;22:84.

4.2. Segundo estudio

El segundo estudio responde al siguiente objetivo:

- 1.2. Describir los cuadros clínicos más graves: la neumonía/síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA).

Hernández-García M, Solito C, Pavón Ruiz A, Arguedas Casamayor N, Melé-Casas M, Pons-Tomàs G, F.de Sevilla M, Pino R, Launes C, Guitart C, Girona-Alarcón M, Jordan I, García-García JJ. Characteristics and Risk Factors Associated with SARS-CoV-2 Pneumonias in Hospitalized Pediatric Patients: A Pilot Study. *Children (Basel)*. 2023 Oct 19;10(10):1703. doi: 10.3390/children10101703. PMID: 37892366; PMCID: PMC10605629.

Resumen:

Introducción: La neumonía por SARS-CoV-2 en la población pediátrica tiene una menor incidencia y gravedad en comparación con los adultos. Los factores de riesgo son la adolescencia y las comorbilidades.

Objetivo: Describir las características de los pacientes pediátricos ingresados por neumonía por SARS-CoV-2, identificar los factores de riesgo asociados a gravedad y comparar los casos en función de la variante de SARS-CoV-2 predominante.

Material y métodos: Estudio descriptivo y retrospectivo que incluyó a pacientes de 0 a 18 años ingresados en un hospital de tercer nivel entre el 1 de marzo 2020 y 1 de marzo de 2022. Se analizaron los datos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos.

Resultados: El estudio incluyó 44 pacientes. 26 (59%) eran varones y 18 (41%) eran mayores de 12 años. 36 (82%) pacientes tenían comorbilidades asociadas, las más frecuentes fueron obesidad y asma. 13 (30%) pacientes precisaron ingreso en UCI por mayor necesidad de soporte respiratorio. 7 (15.9%) pacientes necesitaron oxigenoterapia de alto flujo, 11 (25%) ventilación no invasiva y 4 (9.1%) ventilación mecánica. Los pacientes que desarrollaron una clínica más grave presentaron mayor grado de anemia, linfopenia, hipoalbuminemia, mayores

niveles de procalcitonina y LDH y menores niveles de colesterol HDL. Los pacientes exprematuros demostraron tener mayor riesgo de ingreso en UCI.

De entre las diferencias observadas entre las distintas variantes del SARS-CoV-2, los pacientes durante la ola de Ómicron fueron más pequeños. Ninguna variante demostró asociarse a mayor gravedad clínica de la neumonía.

Conclusiones: Los pacientes pediátricos con neumonía por SARS-CoV-2 con antecedente de prematuridad o con un perfil analítico de anemia, linfopenia, hipoalbuminemia, elevación de la PCT o la LDH o niveles bajos de colesterol HDL probablemente requieran ingreso o presenten una forma de la enfermedad más grave. Además de la edad, no se observaron diferencias notables en las características de los pacientes con neumonía en función de la variable de SARS-CoV-2 predominante.

Article

Characteristics and Risk Factors Associated with SARS-CoV-2 Pneumonias in Hospitalized Pediatric Patients: A Pilot Study

María Hernández-García ^{1,2,†} , Claudia Solito ^{1,†} , Alba Pavón Ortiz ¹, Noelia Arguedas Casamayor ¹, Maria Melé-Casas ^{1,2} , Gemma Pons-Tomás ^{1,2} , Mariona F. de Sevilla ^{1,2,3,4} , Rosa Pino ¹ , Cristian Launes ^{1,2,3,4} , Carmina Guitart ^{2,5} , Mònica Girona-Alarcón ^{2,5} , Iolanda Jordan ^{2,3,4,5,*}  and Juan José García-García ^{1,2,3,4} 

- ¹ Paediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, 08950 Barcelona, Spain; maria.hernandezg@sjd.es (M.H.-G.); claudia.solito@sjd.es (C.S.); alba.pavon@sjd.es (A.P.O.); noelia.arguedas@sjd.es (N.A.C.); maria.mele@sjd.es (M.M.-C.); gemma.pons@sjd.es (G.P.-T.); mariona.fernandez@sjd.es (M.F.d.S.); rosamaria.pino@sjd.es (R.P.); cristian.launes@sjd.es (C.L.); juanjose.garciag@sjd.es (J.J.G.-G.)
- ² Infectious Diseases and Microbiome, Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), 08950 Barcelona, Spain; carmina.guitart@sjd.es (C.G.); monica.girona@sjd.es (M.G.-A.)
- ³ Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBER-ESP), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- ⁵ Paediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, 08950 Barcelona, Spain
- * Correspondence: yolanda.jordan@sjd.es
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Hernández-García, M.; Solito, C.; Pavón Ortiz, A.; Arguedas Casamayor, N.; Melé-Casas, M.; Pons-Tomás, G.; F. de Sevilla, M.; Pino, R.; Launes, C.; Guitart, C.; et al. Characteristics and Risk Factors Associated with SARS-CoV-2 Pneumonias in Hospitalized Pediatric Patients: A Pilot Study. *Children* **2023**, *10*, 1703. <https://doi.org/10.3390/children10101703>

Academic Editor: Francesca Santamaria

Received: 1 September 2023

Revised: 11 October 2023

Accepted: 16 October 2023

Published: 19 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: SARS-CoV-2 pneumonia in children has a lower incidence and severity compared to adults. Risk factors are adolescence and comorbidities. Our aims were to describe the characteristics of children admitted with SARS-CoV-2 pneumonia, identify risk factors associated with severity and compare the cases according to the variant of SARS-CoV-2. This was a descriptive and retrospective study, including patients aged 0–18 years hospitalized in a tertiary-care hospital between 1 March 2020 and 1 March 2022. Epidemiological, clinical, diagnostic and therapeutic data were analyzed. Forty-four patients were admitted; twenty-six (59%) were male and twenty-seven (61%) were older than 12 years. Thirty-six (82%) had comorbidities, the most frequent of which were obesity and asthma. Seven (15.9%) patients required high-flow oxygen, eleven (25%) non-invasive ventilation and four (9.1%) conventional mechanical ventilation. In critically ill patients, higher levels of anemia, lymphopenia, procalcitonin, lactate dehydrogenase (LDH) and hypoalbuminemia and lower levels of HDL-cholesterol were detected (all $p < 0.05$). Prematurity ($p = 0.022$) was associated with intensive care unit admission. Patients were younger during the Omicron wave ($p < 0.01$); no variant was associated with greater severity. In conclusion, pediatric patients with a history of prematurity or with anemia, lymphopenia, elevated procalcitonin, elevated LDH levels, hypoalbuminemia and low HDL-cholesterol levels may require admission and present more severe forms. Apart from age, no notable differences between SARS-CoV-2 variant periods were found.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; pneumonia; pediatrics; risk factors

1. Introduction

During the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic, the epidemiology and clinical presentation of COVID-19 in the pediatric population have been largely studied. In general, the literature describes a lower incidence and transmission of the disease in children, together with a lower severity of the clinical course [1–3].

Regarding the need for hospitalization in pediatric patients, many studies have focused on describing cases of severe disease in children who require admission to pediatric intensive care units (PICUs), such as multisystem inflammatory syndrome in children

(MIS-C) [4]. Given the low global impact of this infection in children and adolescents, there are few studies evaluating the total hospitalization rate in this population, considering both severe and mild cases [5,6].

In addition to MIS-C, other conditions have been described with respiratory involvement in children, such as pneumonia, bronchitis or bronchiolitis [7]. In fact, among hospitalized children with SARS-CoV-2 infection, the most frequent reported diagnosis has been pneumonia [8,9]. However, the clinical characteristics of SARS-CoV-2 pneumonia in pediatric patients are not well defined [10]. In this line, Jiménez-García et al. reported that of all the cases of children admitted with a diagnosis of pneumonia during the first wave of the pandemic in Spain, only 20% were ultimately attributable to SARS-CoV-2 infection [11].

In this sense, it has been difficult to carry out comparative studies because, on the one hand, the overall incidence of SARS-CoV-2 infection in children has been low, and on the other hand, the incidence of community-acquired pneumonia in the pediatric population has decreased drastically, especially at the beginning of the pandemic secondary to isolation measures (lockdowns, use of face masks, social distancing) [12,13]. And finally, with the start of systematic vaccination against SARS-CoV-2, a notable reduction in COVID-19 has also been observed in terms of incidence, hospitalization rate and deaths [14]. The main aim of this study was to describe the characteristics of pediatric patients admitted for SARS-CoV-2 pneumonia, whose diagnostic criteria are not standardized, unlike in the adult population, as well as to identify risk factors associated with greater severity. It must be considered that viral pneumonia in children, especially those under 5 years of age, is a common pathology that often leads to hospitalization. Specifically regarding SARS-CoV-2, children under 5 years of age are not yet eligible to be vaccinated, and therefore are a vulnerable population to SARS-CoV-2. Consequently, it is of interest to be able to provide more information about this pathology in the pediatric population. Furthermore, being able to identify risk factors associated with severity is important to detect early those patients who may have an unfavorable evolution and, therefore, who may benefit from early diagnosis and treatment.

Our secondary objective was to compare the characteristics of the cases according to the predominant variant of SARS-CoV-2 in order to find differences between them.

2. Materials and Methods

2.1. Design, Subjects and Setting

This was a descriptive and retrospective pilot study. Patients aged 0–18 years admitted to Sant Joan de Déu hospital with SARS-CoV-2 pneumonia between 1 March 2020 and 1 March 2022 were included. This is a university-based, pediatric tertiary care hospital with 345 beds (28 PICU beds), and it is estimated to manage 30% of all annual pediatric hospitalizations in Catalonia (Spain).

All included patients were required to have tested positive for SARS-CoV-2, either by detection of SARS-CoV-2 RNA via real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in nasopharyngeal swab/aspirate (NS/NPA) or saliva, or by detection of SARS-CoV-2 antigen in a nasopharyngeal swab. Respiratory symptoms and radiological pneumonia diagnosis, either by chest X-ray (CXR) or CT-scan, were also required. The exclusion criteria were patients with symptoms or radiological pneumonia diagnosis but isolation of another microorganism or patients with SARS-CoV-2 infection but without associated pneumonia.

In our center, the hospitalization criteria for a patient with SARS-CoV-2 infection were being less than 3 months old (according to their clinical situation), having hypoxemia ($\text{SatO}_2 < 92\%$), having moderate or severe respiratory distress or others (bad general condition, lethargy, refusal to eat, apnea...). In addition to these criteria, admission was assessed for patients with pneumonia with a viral appearance (bilateral consolidation, lymphopenia...) and persistent fever and those patients with severe comorbidities and risk of rapid deterioration.

The criteria for admission to the PICU were severe respiratory distress despite optimizing treatment in the ward, $\text{SatO}_2 < 92\%$ with $\text{FiO}_2 \geq 0.5$, acute respiratory acidosis (hypercapnia > 55 mmHg and/or $\text{pH} < 7.3$), septic appearance, signs of shock, altered level of consciousness and/or suspicion of hypoventilation of central origin.

The first vaccination campaign against SARS-CoV-2 in Spain for the population between 16 and 29 years old began on 30 June 2021. The campaign for the population between 12 and 15 years old started on 4 August 2021, and the one for the population between 5 and 11 years old started on 15 December 2021 [15].

2.2. Variables

Epidemiological, clinical, diagnostic (laboratory and radiographic) and therapeutic data from the electronic medical records were reviewed and incorporated into a database located in a protected folder hosted on the hospital's servers for subsequent descriptive and comparative analysis. No personal or identifiable data were collected. For the analysis of risk factors, the differences between patients who presented greater severity (PICU admission, greater need for ventilation) and those with a better clinical evolution were analyzed and compared.

RT-PCR of multiple respiratory viruses (apart from SARS-CoV-2) from nasopharyngeal/tracheal aspirate (NPA/TA) or bronchoalveolar lavage (BAL) were conducted for some selected patients in the ward and all those admitted to the PICU to elucidate other etiologies.

Blood tests were performed on all patients at admission and repeated during hospitalization depending on their clinical evolution. Blood cultures were performed in cases of fever, sepsis or worsening of the general condition.

CXR and CT-scans were interpreted by at least two authors to minimize selection bias.

Patients were classified in different periods according to the predominant SARS-CoV-2 variant to analyze if there were differences between them. According to the literature [16–18], the periods were defined as: Wuhan period (March 2020–February 2021), Alpha period (B.1.1.7; February 2021–June 2021), Delta period (B.1.617.1; June 2021–December 2021) and Omicron period (B.1.1.529; December 2021–March 2022).

The specific treatment of SARS-CoV-2 pneumonia followed the hospital guidelines and protocols, which were in accordance with the literature. The use of corticosteroids was analyzed separately when indicated as a specific COVID-19 treatment or indicated for associated bronchospasm.

2.3. Statistical Analysis and Ethics

Categorical variables were expressed as total number and proportions, while continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR). The comparison of categorical variables was performed using the Chi-Square test and Fisher's exact test; continuous variables were compared using Student's t-test and the ANOVA test. The odds ratio, determined with Fisher's exact test and a 2×2 table, was used to assess the association between the risk factors and the severity. All tests were two-sided, and p -values less than 0.05 were considered to indicate a statistically significant difference. Statistical analyses and graphing were performed using SPSS®, version 25.0.

The study was carried out in accordance with the Helsinki declaration and approved by the Ethical Assistant Committee of Sant Joan de Déu Foundation (code: PIC-90-22; approval date: 12 September 2022). The study followed the requirements of Law 14/2007 of 3 July on Biomedical Research. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study or their parents/legal guardians (in the case of children under 16 years old).

3. Results

3.1. Epidemiological Data

Forty-four patients were admitted with a diagnosis of SARS-CoV-2 pneumonia; twenty-six (59%) were male and the median age was 14 years old (IQR 9–16). Twenty-seven (61%) patients were older than 12 years.

Regarding the distribution of patients in periods according to the predominant SARS-CoV-2 variants, 14 (31.8%) patients were reported in the Wuhan period, 7 (15.9%) in the Alpha period, 11 (25%) in the Delta period and 12 (27.3%) in the Omicron period.

Only two (4.5%) patients were completely vaccinated with two doses of SARS-CoV-2 vaccine at the time of admission.

Thirty-six (82%) patients had at least one comorbidity, and the most frequent were overweight/obesity in thirteen (29.5%) patients and asthma/recurrent wheezing in thirteen (29.5%), followed by other pulmonary and neurological disorders. All the comorbidities as well as other epidemiological data of the patients are reported in Table 1.

Table 1. General description of the patients (n = 44).

Epidemiological Data	
Gender (male)	26 (59%)
Age (years)	14 (9–16)
Distribution according to the predominant SARS-CoV-2 variant:	
Wuhan period	14 (31.8%)
Alpha period	7 (15.9%)
Delta period	11 (25%)
Omicron period	12 (27.3%)
Presence of at least one comorbidity	36 (82%)
Comorbidities:	
Obesity/Overweight	13 (29.5%)
Recurrent wheezing/Asthma	13 (29.5%)
Other pulmonary disease	10 (22.7%)
Other neurological disorder	9 (20.5%)
Prematurity $\leq$ 34 GA	5 (11.4%)
Bronchopulmonary dysplasia	2 (4.5%)
Neuromuscular disorder	4 (9.1%)
Immunodeficiency	4 (9.1%)
Nephropathy	3 (6.8%)
Down syndrome	3 (6.8%)
Cerebral palsy	2 (4.5%)
Cardiopathy	2 (4.5%)
Diabetes mellitus	2 (4.5%)
Other metabolic disorder	2 (4.5%)
Sickle cell anemia	0 (0%)
Other diseases	18 (40.9%)
Hospital stay (days)	5 (3–9)
Admission to the PICU	13 (30%)
PICU stay (days)	5 (4–14)
Complications	7 (15.9%)
Outcome (death)	2 (4.5%)

The results are expressed as counts and percentages (in parenthesis) and as median and interquartile range (25–75) accordingly. GA: gestational age; PICU: pediatric intensive care unit.

The median days from symptom onset to diagnosis of SARS-CoV-2 infection was 1 day (IQR 0–4), and from symptom onset to SARS-CoV-2 pneumonia diagnosis and hospital

admission it was 5.5 days (IQR 3–8). Nasopharyngeal RT-PCR was the most-used diagnostic method in 30 (68%) patients, followed by nasopharyngeal antigen (32%).

Patients had a median hospital stay of 5 days (IQR 3–9). Thirteen (30%) patients were admitted to the PICU, with a median stay at the PICU of 5 days (IQR 4–14) and a median total hospital stay of 13 days (IQR 7–18).

Regarding complications, four (9.1%) patients had pleural effusion, two (4.5%) had a ventilator-associated pneumonia (VAP) and one (2.3%) had pneumothorax.

No patient presented persistent symptoms or pulmonary sequelae.

Two patients died from COVID-related conditions; both had severe comorbidities. The first patient was a 12-year-old boy with acute lymphocytic leukemia with recurrence who had received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) with secondary complications such as graft-versus-host-disease (GVHD). The second patient was an 8-year-old boy with a history of extreme prematurity, severe neurodevelopmental disorder and recurrent pulmonary infections.

3.2. Clinical and Radiologic Data

All patients presented symptoms at admission. The most frequent ones were fever (90.9%), cough (77.3%) and respiratory distress (75%). The median temperature at admission was 39 °C (IQR 38.5–39.5). All the signs and symptoms are described in Figure 1.

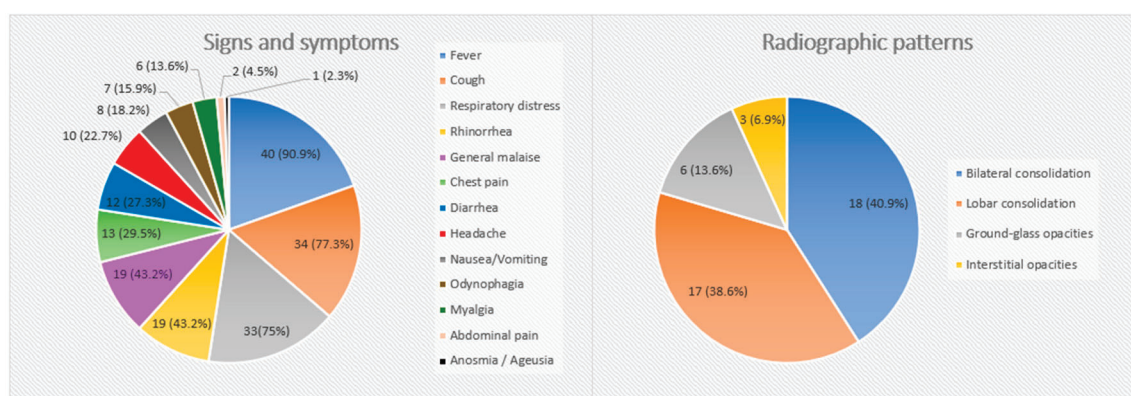


Figure 1. Clinical and radiologic data of the patients. The results are expressed as counts and percentages (in parenthesis).

Thirty-seven (84%) patients were diagnosed with pneumonia, while seven (16%) had bronchopneumonia.

All patients underwent a chest X-ray (CXR). The most common radiological patterns were bilateral consolidation in 18 (40.9%) patients, followed by lobar consolidation in 17 (38.6%), ground-glass opacities alone in 6 (13.6%) and interstitial opacities in 3 (6.9%). The radiological pattern of bilateral consolidation was more frequently observed in patients older than 12 years of age, without statistically significant differences (14 vs. 4; $p = 0.409$). The distribution of the radiological patterns is described in Figure 1.

A CT-scan was performed in four patients. In two cases, a CT-Angiography (CTA) was performed to exclude pulmonary thromboembolism due to persistent hypoxemia. The other two cases involved patients receiving immunosuppressive treatment, in whom a CT was requested to evaluate the lung parenchyma in the context of COVID infection, as well as to rule out complications such as a fungal superinfection. All scans showed areas of increased density and ground glass opacities with an alveolar, bilateral and diffuse pattern, predominantly in upper lobes, with no findings of thromboembolism in any case.

3.3. Laboratory Data

The results of the blood tests are shown in Table 2. In general, it stands out that the majority of patients had lymphopenia, mild neutrophilia, as well as elevated C-reactive

protein (CRP), ferritin, lactate dehydrogenase (LDH), fibrinogen and interleukin-6 (IL-6). They also highlight an elevation of d-dimer and transaminases, as well as hypoalbuminemia and low HDL cholesterol.

Table 2. Laboratory results comparing severity (patients who required admission to the PICU and those who did not).

Parameter	Reference Values	All Patients (n = 44)	Patients Admitted to the PICU (n = 13)	Patients Not Admitted to the PICU (n = 31)	p-Value
Complete Blood count					
Hemoglobin; minimum (g/dL)	12–16	12.3 (10.8–14.4)	10.6 (9.3–12.6)	13 (11.6–14.7)	0.005
Platelets; minimum ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	150–500	181 (140–226)	182 (169–238)	181 (133–225)	0.938
Leucocyte count; maximum (/mm ³)	5000–12,000	8150 (5850–11,050)	9400 (7400–12,800)	7700 (5600–10,300)	0.320
Lymphocyte count; minimum (/mm ³)	1400–3300	850 (600–1500)	500 (350–850)	1200 (700–1700)	0.002
Neutrophile count; maximum (/mm ³)	1500–5000	5750 (3250–7750)	7200 (5000–8500)	4800 (3100–7000)	0.269
Coagulation					
PT; minimum (%)	75–120	79 (72–92)	75 (71–89.5)	81 (72–93)	0.533
aPTT; maximum (seconds)	21–35	26.5 (24.4–29.5)	28.7 (23.5–31.3)	26.5 (24.8–28.9)	0.794
INR; maximum	0.8–1.2	1.12 (1.04–1.20)	1.16 (1.04–1.24)	1.11 (1.04–1.17)	0.305
Fibrinogen; maximum (g/L)	1.5–3.5	4.9 (4.5–6.4)	4.8 (4.2–6.6)	4.9 (4.6–6.4)	0.470
D-dimer; maximum (mg/L)	<0.5	0.9 (0.61–1.94)	1.27 (0.88–2.29)	0.69 (0.42–1.87)	0.613
Biochemistry					
C-reactive protein; maximum (mg/L)	0–15	39.5 (14.7–94)	63.2 (26–156)	35.5 (12–69)	0.216
Procalcitonin; maximum (ng/mL)	<0.5	0.17 (0.06–0.58)	0.52 (0.19–1.5)	0.09 (0.06–0.34)	0.019
Ferritin; maximum ($\mu\text{g/L}$)	10–120	350.2 (190.7–1246)	1150 (400–1800)	265 (185–685)	0.158
LDH; maximum (IU/L)	<500	837 (621–1093)	930 (800–1900)	790 (580–1050)	0.021
IL-6; maximum (pg/mL)	<5	32.1 (8.5–91.9)	41.9 (26.7–101.9)	9.6 (5.8–129)	0.414
Troponin; maximum (ng/mL)	<0.200	0.002 (0.001–0.007)	0.007 (0.004–0.02)	0.001 (0.0007–0.003)	0.075
NT-ProBNP; maximum (ng/L)	<125	66 (17–163)	196 (93–3400)	19 (14–61)	0.197
Creatin kinase; maximum (UI/L)	64–288	67 (43–144)	57 (28–213)	75 (45–134)	0.467
Sodium; average (mmol/L)	135–145	139 (137–142)	141 (137–145)	139 (136–141)	0.137
Potassium; average (mmol/L)	3.9–5	4.1 (3.8–4.3)	3.9 (3.6–4.1)	4.1 (3.8–4.3)	0.193
Ionic Calcium; average (mmol/L)	1.17–1.30	1.22 (1.15–1.26)	1.23 (1.14–1.28)	1.21 (1.16–1.24)	0.533
Phosphate; average (mg/dL)	3.5–5.7	3.75 (3.15–4.3)	3.75 (2.87–4.65)	3.8 (3.2–4.3)	0.954
Magnesium; average (mg/dL)	1.8–2.3	2.1 (1.8–2.2)	2 (1.7–2.3)	2.1 (1.8–2.2)	0.406
Creatinine; maximum (mg/dL)	<0.90	0.59 (0.47–0.72)	0.58 (0.46–0.81)	0.59 (0.46–0.72)	0.153
AST; maximum (IU/L)	2–38	48 (30–93)	54 (33–123)	46 (30–63)	0.800

Table 2. Cont.

Parameter	Reference Values	All Patients (n = 44)	Patients Admitted to the PICU (n = 13)	Patients Not Admitted to the PICU (n = 31)	p-Value
ALT; maximum (IU/L)	2–31	39 (22–105)	59 (22–106)	36 (21–116)	0.511
Total Bilirubin; maximum (mg/dL)	0.2–1	0.35 (0.3–0.57)	0.5 (0.3–0.85)	0.35 (0.27–0.52)	0.234
Conjugated Bilirubin; maximum (mg/dL)	<0.2	0.2 (0.1–0.3)	0.2 (0.1–0.3)	0.2 (0.1–0.25)	0.329
Albumin; minimum (mg/dL)	37–54	33 (28–37)	29 (28–32)	37 (35–38)	0.008
Triglycerides; average (mg/dL)	38–161	125 (73–286)	205 (75–327)	105 (57–170)	0.159
Total cholesterol; average (mg/dL)	95–201	129 (89–157)	129 (94–161)	121 (85–160)	0.888
HDL cholesterol; average (mg/dL)	>40	26 (21–32)	23 (17–26)	30 (24–38)	0.017
LDL cholesterol; average (mg/dL)	<147	85 (62–97)	87 (62–101)	81 (50–97)	0.922
VLDL cholesterol; average (mg/dL)	0–24	22 (14–41)	28 (15–54)	18 (12–28)	0.359

The results are expressed as median and interquartile range (25–75). PICU: pediatric intensive care unit, CRP: C-reactive protein, PCT: procalcitonin, LDH: lactate dehydrogenase, IL-6: interleukin-6, PT: prothrombin time, aPTT: activated partial thromboplastin time, INR: international normalized ratio, NT-ProBNP: N-terminal pro brain natriuretic peptide, CK: creatin kinase, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, HDL cholesterol: high-density lipoprotein cholesterol, LDL cholesterol: low-density lipoprotein cholesterol, VLDL cholesterol: very low-density lipoprotein cholesterol.

In critically ill patients (those admitted to the PICU), higher procalcitonin (PCT) ($p = 0.019$) and LDH levels ($p = 0.021$) were detected, as well as higher anemia ($p = 0.005$), lymphopenia ($p = 0.002$), hypoalbuminemia ($p = 0.008$) and lower HDL cholesterol levels ($p = 0.017$). All the results comparing severity (patients who required admission to the PICU and those who did not) are shown in Table 2.

In patients who required any type of respiratory support (all those who required oxygen), higher lymphopenia ($p = 0.037$) and neutrophilia ($p = 0.003$) were detected, as well as higher C-reactive protein ($p = 0.046$) and aspartate aminotransferase (AST) levels ($p = 0.009$). Patients who required non-invasive ventilation (NIV) had greater anemia ($p = 0.003$) and lymphopenia ($p = 0.005$), higher values of PCT ($p = 0.008$) and LDH ($p = 0.006$) and lower levels of albumin ($p = 0.008$) and HDL cholesterol ($p = 0.012$). Finally, patients who required conventional mechanical ventilation (CMV) had greater anemia ($p = 0.001$) and higher values of ferritin ($p = 0.002$) and triglycerides ($p = 0.001$). All the results comparing the need for respiratory support are shown in the Supplementary Material.

3.4. Microbiological Data

Viral coinfections were tested in 20 (45%) patients: RSV was found in three (15%) cases, rhino/enterovirus, influenza B and parainfluenza 3 in one (5%) case and adenovirus in one (5%) case.

Bacterial coinfection was observed in four (9%) patients: one (25%) patient with a history of bronchiectasis had a positive sputum culture for *S. pneumoniae*; one (25%) patient who required NIV had a positive *S. aureus* PCR in the NPA; and two (50%) patients developed VAP due to *S. maltophilia* and *S. marcescens* superinfection, both of which were isolated in a BAL culture.

Lastly, one patient with a single kidney and a history of recurrent urinary tract infections had a positive urine culture for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) *K. pneumoniae* during admission.

Blood cultures were performed in 41 patients, and all of them were negative; PCR for *S. pneumoniae* in blood was performed in 8 patients, and all of them were also negative.

3.5. Therapeutical Data

All treatment data are described in Table 3.

Table 3. Treatment of the patients.

Treatment	Patients; n (%)	Duration; Days (IQR)
Respiratory support		
Low-flow oxygen (LFO)	34 (77.3%)	3 (2–5)
High-flow oxygen (HFO)	7 (15.9%)	2 (1–4)
Non-invasive ventilation (NIV)	11 (25%)	4 (3–5)
Conventional mechanical ventilation (CMV)	4 (9.1%)	8.5 (7–12)
Corticosteroids (used as COVID-19 treatment)		
Methylprednisolone	14 (48.3%)	
Dexamethasone	13 (44.8%)	
Hydrocortisone	1 (3.4%)	
Prednisone	1 (3.4%)	
Total ¹	29/44 (65.9%)	5 (3–10)
Antibiotics		
Respiratory superinfection suspicion	34 (77.3%)	7 (3–10)
Other superinfection suspicion (e.g., UTI)	1 (2.3%)	10
Azithromycin (COVID targeted treatment) ²	6 (13.6%)	5
Antivirals		
Remdesivir	7 (15.9%)	5 (5–7)
Immunomodulators		
Tocilizumab	4 (9.1%)	1
Other monoclonal antibodies (Siltuximab, Anakinra)	1 (2.3%)	1
Other treatments		
Heparin (prophylaxis)	33 (75%)	
Hydroxychloroquine ³	6 (13.6%)	

¹ Intravenous: 28 (96.6%), oral: 1 (3.4%). ^{2,3} It was only used in the Wuhan period. IQR: interquartile range; UTI: urinary tract infection.

Thirty-seven (84.1%) patients required respiratory support. Of the four patients who required CMV, all of them had previously received NIV. The seven patients who did not require respiratory support were high-risk patients with underlying conditions (immunodeficiency, neuromuscular disease...) admitted to the hospital for monitoring and observation or intravenous antibiotic therapy. Two patients required inotropic support for 1–2 days, with a mean Vasoactive Inotropic Score (VIS) of 20 points. No patients required ExtraCorporeal Membrane Oxygenation (ECMO).

3.6. Risks Factors Associated with Severity

Among the comorbidities, prematurity was significantly associated with a higher risk of admission to the PICU (OR 13.3; 95%CI 1.3–134.9; $p = 0.022$) and a higher need for advanced respiratory support: NIV (OR 18.2; 95%CI 1.7–189.6; $p = 0.010$) and CMV (OR 57; 95%CI 3.9–825; $p = 0.003$). Neither gender nor any of the age groups were significantly associated with greater severity (need for PICU admission or need for advanced respiratory support). Nor was an association found between viral coinfection, bacterial coinfection, longer time until diagnosis, longer time until admission and greater severity. All these comparisons are described in the Supplementary Material.

3.7. Differences Regarding SARS-CoV-2 Variant Periods

Differences between patients according to the periods of the predominant SARS-CoV-2 variants are shown in the Supplementary Material. In the cases reported during the Wuhan, Alpha and Delta periods, the majority of patients were older than 12 years (median age in years: 14.8, 12.7 and 14.4, respectively), while in the Omicron period the majority were younger (median age 6.1 years) ($p = 0.001$). Regarding gender and comorbidities, no statistically significant differences between periods were found.

Regarding symptoms, rhinorrhea was more frequently observed in the Omicron period ($p = 0.010$), diarrhea was more frequently observed in the Wuhan and Alpha periods ($p = 0.037$) and odynophagia was more frequent in the Delta period ($p = 0.020$).

The most frequent radiological patterns according to periods were lobar consolidation and bilateral consolidation in the Wuhan period, interstitial opacities in the Alpha period, bilateral consolidation in the Delta period and lobar consolidation in the Omicron period. These differences were statistically significant ($p = 0.005$).

There were no significant differences in terms of severity factors (greater stay, complications, need for admission to the PICU, respiratory support of any type or treatment with steroids, remdesivir or monoclonal antibodies) among periods.

4. Discussion

This article describes the clinical characteristics and risk factors associated with SARS-CoV-2 pneumonia in hospitalized pediatric patients. Several studies have previously reviewed the characteristics of SARS-CoV-2 pneumonia in adults [10], but scarce data are available for the pediatric population. However, pneumonia is one of the main causes of admission in children and adolescents with SARS-CoV-2 infection and is associated with high morbidity [7,9]. This study provides more information about this pathology in the pediatric population, helping to identify patients earlier, especially those who are at greater risk of presenting a torpid evolution, and therefore offering them optimal management, thus improving their prognosis.

SARS-CoV-2 pneumonia in the pediatric population has been more frequently described in adolescents and patients with comorbidities [19,20]. In our study, most patients were older than 12 years and 82% had one or more comorbidities. Our hospital is a tertiary referral center for rare and complex diseases, although it is also a community hospital in the referral area. This may partly explain the high percentage of patients with comorbidity, or it may also indicate that these patients tend to develop more severe pneumonia than the general population. The most frequently observed comorbidities in our study were overweight/obesity and asthma/recurrent wheezing. Obesity has been shown to be a clear risk factor for severe SARS-CoV-2 infection [19,21]. Regarding asthma, it has been associated with a higher rate of hospitalization in children with SARS-CoV-2 infection, but it does not worsen the prognosis of the infection. SARS-CoV-2 also has not been described as a trigger for asthmatic exacerbations [9,22].

Severe COVID-19 is rare in children: PICU admission rates are described around 15% [5,6,9]. In our cohort, the need for PICU admission was double, perhaps overestimated due to the limited sample size and also due to the selection of the sample including only patients with pneumonia (in other series published in our center, the actual PICU admission rate relative to all admitted COVID patients was lower [23–26]). Fortunately, in the current study the prognosis was found to be favorable, with a low rate of complications and mortality (<5% reported in previous articles; 4.5% in our study); the latter is directly associated with the presence of underlying conditions and not with SARS-CoV-2 as such [27,28].

As in other previously published studies, the most frequent symptoms in our patients were fever, cough and respiratory distress [20,29]. Regarding the radiological characteristics, most of the reviews agree that the findings found in children differ from those found in adults and that it is not necessary to routinely perform a lung CT-scan in addition to a CXR in the pediatric population [30–32]. Some authors even propose the extension of the use of lung ultrasound given its great utility without providing radiation [25,33]. In our study, as

reported previously [31,32], the most frequent radiological patterns were the presence of consolidation (especially bilateral) and ground glass opacities.

The role of certain biomarkers in the definition of severe COVID-19 has been investigated, highlighting lymphopenia, acute phase reactants and some cytokines [34–36]. In the specific case of COVID-19 pneumonia, even though in the pediatric population the inflammatory response is much lower than in adults [37], the remarkable elevation of cytokines such as IL-6 has been described [38,39]. In our cohort, most patients presented elevated IL-6 values, with a median of 32.1 pg/mL. In relation to this, Shafiek et al. defined the IL-6 cut-off value as a predictor of severe pneumonia in children at 31.7 pg/mL [38]. In fact, in our cohort it was observed that the patients who required admission to the PICU had higher values of IL-6 compared to the rest, although the difference was not statistically significant. On the other hand, in our study patients with severe pneumonia requiring PICU admission had greater anemia and lymphopenia, higher PCT and LDH values, as well as lower levels of albumin and HDL cholesterol. Regarding HDL cholesterol, reviews have recently been published on the role of lipids in SARS-CoV-2 infection in adults, finding that lower levels of total cholesterol, LDL and HDL are associated with greater severity and mortality [40].

As other authors have suggested, ruling out the presence of coinfections with other respiratory viruses should be considered in any child presenting with severe SARS-CoV-2 pneumonia, as it may be useful in its management [41]. In addition, it is considered a challenge to differentiate the signs and symptoms of SARS-CoV-2 pneumonia compared to other viral pneumonias in children, as several researchers have demonstrated [11,28,41]. In our study, even though not all patients were tested, the viral coinfection rate was 11.3%, similar to that reported in the literature. Although probably due to the small sample, no association was found between viral coinfection and greater severity of the patients.

Regarding treatment, like other viral pneumonias, most of the patients in our cohort required respiratory support with low-flow oxygen therapy. Characteristically, 25% required non-invasive ventilation and 9.1% required mechanical ventilation, higher percentages compared to other cases of viral pneumonia, which is why some authors have suggested that the lung damage associated with SARS-CoV-2 is different from that caused by other viruses [28]. On the other hand, 77.3% of the patients required antibiotic treatment for suspected respiratory superinfection. These data may be overestimated, given that all the patients in our sample required hospitalization and therefore were considered more severe than any patient with pneumonia managed in an outpatient setting.

Several risk factors associated with the development of severe disease in pediatric patients with COVID-19 have been described, including age (under 5 years and adolescents); previous comorbidities; symptoms of cough, dyspnea and fever on admission; and lymphopenia, elevated CRP and LDH [34,35,42,43]. Considering some of these variables, Satdhabudha et al. developed a predictive risk score for the development of COVID-19 pneumonia in children. In addition, since this score includes only demographic and clinical variables, the authors suggest that it could reduce the risk of unnecessary radiation exposure in these patients [44]. In our study, the only risk factor associated with greater severity was a history of prematurity, as previously described in the literature [42].

Finally, although it was initially thought that the transmission and impact of SARS-CoV-2 would be lower in the summer season, it was found that the spread of SARS-CoV-2 was independent of the time of year. In our study, the number of patients affected by pneumonia was similar during the four studied periods. Regarding the comparison between periods, we found that the age of the patients in the Omicron period was significantly lower compared to the other periods. These data coincide with other previously published data that showed an increase of up to five times during the Omicron period in the hospitalization rate of children aged 0–4 years old, a population that is not yet eligible for vaccination at this time [45].

Our study has some limitations. In the first place, there are those inherent to a single-center and retrospective study (that limits the ability to establish causality), in addition to

the small size of the sample. Similarly, only hospitalized patients were included, so the total incidence of pneumonia due to SARS-CoV-2 may be underestimated, since outpatient pneumonias were not included. In addition, some cases had incomplete data in their medical records, and not all patients underwent a complete blood test or microbiological study. As well, linking a patient to a variant only for the predominant period of the variant, without knowing the true sequence of the virus causing the infection, may be a bias. Finally, the radiographic patterns could have been described differently depending on the observer, raising the possibility of biases.

5. Conclusions

In conclusion, pediatric patients with SARS-CoV-2 pneumonia who require admission are usually older than 12 years and have some associated comorbidity. Although most patients require some type of respiratory support, it is generally low-flow oxygen, and the general prognosis is favorable. A history of severe prematurity, anemia, lymphopenia, elevated PCT and LDH and low levels of albumin and HDL cholesterol are associated with an increased risk of severe pneumonia; therefore, the presence of these data should put us on alert in the care of these patients. Regarding the comparison between periods with different predominant SARS-CoV-2 variants, the patients in the Omicron period were younger compared to the other periods. Future studies with a larger number of patients are necessary to validate the results found, in addition to continuing to study the evolution of this disease with future variants of SARS-CoV-2.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/children10101703/s1>, Table S1: Laboratory results comparing patients who required any type of respiratory support with those who did not and patients who required NIV and CMV with those who did not; Table S2: Evaluation of potential risk factors associated with greater severity: admission to the PICU, need for NIV and need for CMV; Table S3: Differences of the patients regarding SARS-CoV-2 variant periods.

Author Contributions: Conceptualization and study design, M.H.-G., C.S., A.P.O., N.A.C., M.M.-C., G.P.-T., M.F.d.S., R.P., C.L., C.G., M.G.-A., I.J. and J.J.G.-G.; methodology, M.H.-G., C.S., A.P.O. and N.A.C.; formal analysis, M.H.-G., C.S., A.P.O. and N.A.C.; writing—original draft preparation, M.H.-G. and C.S.; writing—review and editing, M.H.-G., C.S., M.M.-C., G.P.-T., M.F.d.S., R.P., C.L., C.G. and M.G.-A.; supervision, I.J. and J.J.G.-G.; funding acquisition, I.J. and J.J.G.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Kids Corona platform (funding from Banco Santander, Stavros Niarkos Foundation and other private donors).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Fundació Sant Joan de Deu (PIC-90-22; approval date: 7 July 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study or their parents/legal guardians (in the case of children under 16 years old).

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available due to the fact that individual privacy could be compromised, but they are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Castagnoli, R.; Votto, M.; Licari, A.; Brambilla, I.; Bruno, R.; Perlini, S.; Rovida, F.; Baldanti, F.; Marseglia, G.L. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Children and Adolescents. *JAMA Pediatr.* **2020**, *174*, 882–889. [CrossRef] [PubMed]
2. Gaythorpe, K.A.M.; Bhatia, S.; Mangal, T.; Unwin, H.J.T.; Imai, N.; Cuomo-Dannenburg, G.; Walters, C.E.; Jauneikaite, E.; Bayley, H.; Kont, M.D.; et al. Children's role in the COVID-19 pandemic: A systematic review of early surveillance data on susceptibility, severity, and transmissibility. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13903. [CrossRef]
3. Chakkour, M.; Salami, A.; Olleik, D.; Kamal, I.; Nouredine, F.Y.; El Roz, A.; Ghssein, G. Risk Markers of COVID-19, a Study from South-Lebanon. *COVID* **2022**, *2*, 867–876. [CrossRef]
4. García-Salido, A.; Vicente, J.C.D.C.; Hofheinz, S.B.; Ramírez, J.B.; Barrio, M.S.; Gordillo, I.L.; Yuste, A.H.; Pardellans, C.G.; Tejedor, M.C.-M.; Labarga, B.H.; et al. Severe manifestations of SARS-CoV-2 in children and adolescents: From COVID-19 pneumonia to multisystem inflammatory syndrome: A multicentre study in pediatric intensive care units in Spain. *Crit. Care* **2020**, *24*, 666. [CrossRef]
5. Kim, T.Y.; Kim, E.C.; Agudelo, A.Z.; Friedman, L. COVID-19 hospitalization rate in children across a private hospital network in the United States: COVID-19 hospitalization rate in children. *Arch. Pediatr.* **2021**, *28*, 530–532. [CrossRef] [PubMed]
6. Uka, A.; Buettcher, M.; Bernhard-Stirneemann, S.; Fougère, Y.; Moussaoui, D.; Kottanattu, L.; Wagner, N.; Zimmermann, P.; Ritz, N.; Albisetti, M.; et al. Factors associated with hospital and intensive care admission in paediatric SARS-CoV-2 infection: A prospective nationwide observational cohort study. *Eur. J. Pediatr.* **2022**, *181*, 1245–1255. [CrossRef] [PubMed]
7. Andina-Martínez, D.; Alonso-Cadenas, J.A.; Cobos-Carrascosa, E.; Bodegas, I.; Oltra-Benavent, M.; Plazaola, A.; Epalza, C.; Jiménez-García, R.; Moraleda, C.; Tagarro, A.; et al. SARS-CoV-2 acute bronchiolitis in hospitalized children: Neither frequent nor more severe. *Pediatr. Pulmonol.* **2022**, *57*, 57–65. [CrossRef]
8. Parisi, G.F.; Indolfi, C.; Decimo, F.; Leonardi, S.; del Giudice, M.M. COVID-19 Pneumonia in Children: From Etiology to Management. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 616622. [CrossRef]
9. Tagarro, A.; Cobos-Carrascosa, E.; Villaverde, S.; Sanz-Santaefemia, F.-J.; Grasa, C.; Soriano-Arandes, A.; Hernanz, A.; Navarro, M.L.; Pino, R.; Epalza, C.; et al. Clinical spectrum of COVID-19 and risk factors associated with severity in Spanish children. *Eur. J. Pediatr.* **2022**, *181*, 1105–1115. [CrossRef]
10. Li, J.; He, X.; Yuan, Y.; Zhang, W.; Li, X.; Zhang, Y.; Li, S.; Guan, C.; Gao, Z.; Dong, G. Meta-analysis investigating the relationship between clinical features, outcomes, and severity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pneumonia. *Am. J. Infect. Control.* **2021**, *49*, 82–89. [CrossRef]
11. Jiménez-García, R.; Nogueira, J.; Retuerta-Oliva, A.; Sainz, T.; Cano-Fernández, J.; Flores-Pérez, P.; Méndez-Echevarría, A.; Villalobos-Pinto, E.; Calleja-Gero, L.; Sanz-Santaefemia, F.J.; et al. Pneumonia in Hospitalized Children during SARS-CoV-2 Pandemic. Is It All COVID-19? Comparison between COVID and Non-COVID Pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2021**, *40*, e111–e113. [CrossRef]
12. Rybak, A.; Yang, D.D.; Schrimpf, C.; Guedj, R.; Levy, C.; Cohen, R.; Gajdos, V.; Tort, J.; Skurnik, D.; Ouldali, N.; et al. Fall of Community-Acquired Pneumonia in Children following COVID-19 Non-Pharmaceutical Interventions: A Time Series Analysis. *Pathogens* **2021**, *10*, 1375. [CrossRef]
13. Nouredine, F.Y.; Chakkour, M.; El Roz, A.; Reda, J.; Al Sahily, R.; Assi, A.; Joma, M.; Salami, H.; Hashem, S.J.; Harb, B.; et al. The emergence of SARS-CoV-2 variant(s) and its impact on the prevalence of COVID-19 cases in the Nabatieh Region, Lebanon. *Med. Sci.* **2021**, *9*, 40. [CrossRef] [PubMed]
14. Borchering, R.K.; Mullany, L.C.; Howerton, E.; Chinazzi, M.; Smith, C.P.; Qin, M.; Reich, N.G.; Contamin, L.; Levander, J.; Kerr, J.; et al. Impact of SARS-CoV-2 vaccination of children ages 5–11 years on COVID-19 disease burden and resilience to new variants in the United States, November 2021–March 2022: A multi-model study. *Lancet Reg. Health Am.* **2023**, *17*, 100398. [CrossRef] [PubMed]
15. Gobierno de España. Estrategia de Vacunación COVID-19. Available online: <https://www.vacunacovid.gob.es/> (accessed on 10 October 2023).
16. Secretaria de Salut Pública—Departament de Salut—Generalitat de Catalunya. Informe de Vigilancia de las Variantes Genómicas del Coronavirus SARS-CoV-2 en Cataluña. Semana 49—2021 (6 Diciembre 2021–12 Diciembre 2021). Casos Notificados al Sistema de Notificación Microbiológica de Cataluña (SNMC). 2021. Available online: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/6958/informe_vigilancia_variants_genomiques_coronavirus_sars_cov2_setmana_49_2021_cas.pdf?sequence=2&isAllowed=y (accessed on 22 February 2023).
17. Secretaria de Salut Pública—Departament de Salut—Generalitat de Catalunya. Informe de Vigilancia de Las Variantes Genómicas Del Coronavirus SARS-CoV-2 En Cataluña. Semana 9—2022 (28 Febrero–6 Marzo 2022). Casos Notificados al Sistema de Notificación Microbiológica de Cataluña (SNMC). 2022. Available online: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/8609/informe_vigilancia_variants_genomiques_coronavirus_sars_cov2_setmana_9_2022_cas.pdf?sequence=2&isAllowed=y (accessed on 22 February 2023).

18. Secretaria de Salut Pública—Departament de Salut—Generalitat de Catalunya. Informe de Vigilancia de Las Variantes Genómicas Del Coronavirus SARS-CoV-2 En Cataluña, Semana 22—2021 (31/05/2021 al 06/06/2021). Casos Notificados al Sistema de Notificación Microbiológica de Cataluña (SNMC). 2021. Available online: https://scientiasalut.gencat.cat/bitstream/handle/11351/6583/informe_vigilancia_variants_genomiques_coronavirus_sars_cov2_setmana_22_2021_cas.pdf?sequence=2&isAllowed=y (accessed on 22 February 2023).
19. Moreno-Noguez, M.; Rivas-Ruiz, R.; Roy-García, I.A.; Pacheco-Rosas, D.O.; Moreno-Espinoza, S.; Flores-Pulido, A.A. Risk factors associated with SARS-CoV-2 pneumonia in the pediatric population. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **2021**, *78*, 251–258. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Ozcan, S.; Emeksiz, S.; Perk, O.; Uyar, E.; Yükses, S.K. Severe Coronavirus Disease Pneumonia in Pediatric Patients in a Referral Hospital. *J. Trop. Pediatr.* **2021**, *67*. [\[CrossRef\]](#)
21. Chao, J.Y.; Sugarman, A.; Kimura, A.; Flamer, S.; Jing, T.T.; Fernandes, D.M.; Khine, H.; Shinnar, S.; Lo, Y.; Cabana, M.D. Factors Associated with Hospitalization in Children and Adolescents with SARS-CoV-2 Infection. *Clin. Pediatr.* **2022**, *61*, 159–167. [\[CrossRef\]](#)
22. Gaietto, K.; Freeman, M.C.; DiCicco, L.A.; Rauenswinter, S.; Squire, J.R.; Aldewereld, Z.; Iagnemma, J.; Campfield, B.T.; Wolfson, D.; Kazmerski, T.M.; et al. Asthma as a risk factor for hospitalization in children with COVID-19: A nested case-control study. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2022**, *33*, e13696. [\[CrossRef\]](#)
23. Melé, M.; Henares, D.; Pino, R.; Asenjo, S.; Matamoros, R.; Fumadó, V.; Fortuny, C.; García-García, J.-J.; Jordan, I.; Brotons, P.; et al. Low impact of SARS-CoV-2 infection among paediatric acute respiratory disease hospitalizations. *J. Infect.* **2021**, *82*, 414–451. [\[CrossRef\]](#)
24. Girona-Alarcon, M.; Bobillo-Perez, S.; Sole-Ribalta, A.; Hernandez, L.; Guitart, C.; Suarez, R.; Balaguer, M.; Cambra, F.-J.; Jordan, I.; KIDS-Corona study group; et al. The different manifestations of COVID-19 in adults and children: A cohort study in an intensive care unit. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 87. [\[CrossRef\]](#)
25. Guitart, C.; Suárez, R.; Girona, M.; Bobillo-Perez, S.; Hernández, L.; Balaguer, M.; Cambra, F.J.; Jordan, I. Lung ultrasound findings in pediatric patients with COVID-19. *Eur. J. Pediatr.* **2021**, *180*, 1117–1123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Ríos-Barnés, M.; Lanaspá, M.; Noguera-Julian, A.; Baleta, L.; De Sevilla, M.F.; Ferri, D.; Götzens, J.; Jordan, I.; Lecina, L.; Monfort, L.; et al. The Spectrum of COVID-19 Disease in Adolescents. *Arch. Bronconeumol.* **2021**, *57*, 84–85. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Wei, J.S. How lethal is SARS-CoV-2 pneumonia when compared with respiratory syncytial virus and influenza in young children? *Aust. J. Gen. Pract.* **2020**, *49*, 683–686. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. del Valle, R.; Ballesteros, Á.; Calvo, C.; Sainz, T.; Mendez, A.; Grasa, C.; Molino, P.R.; Mellado, M.J.; Sanz-Santaefemia, F.J.; Herrero, B.; et al. Comparison of pneumonia features in children caused by SARS-CoV-2 and other viral respiratory pathogens. *Pediatr. Pulmonol.* **2022**, *57*, 2374–2382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Yurtseven, A.; Turan, C.; Özenen, G.G.; Işık, H.; Bal, Z.; Sertöz, R.; Saz, E.U. Characteristics of pediatric COVID-19 patients admitted to the emergency department and factors associated with pneumonia. *Turk. J. Emerg. Med.* **2022**, *22*, 143–148. [\[CrossRef\]](#)
30. Palabiyik, F.; Kokurcan, S.O.; Hatipoglu, N.; Cebeci, S.O.; Inci, E. Imaging of COVID-19 pneumonia in children. *Br. J. Radiol.* **2020**, *93*, 20200647. [\[CrossRef\]](#)
31. Liu, H.; Liu, F.; Li, J.; Zhang, T.; Wang, D.; Lan, W. Clinical and CT imaging features of the COVID-19 pneumonia: Focus on pregnant women and children. *J. Infect.* **2020**, *80*, e7–e13. [\[CrossRef\]](#)
32. Kurian, J.; Blumfield, E.; Levin, T.L.; Liszewski, M.C. Imaging findings in acute pediatric coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Pediatr. Radiol.* **2022**, *52*, 1985–1997. [\[CrossRef\]](#)
33. Roychowdhury, S.; Bhakta, S.; Mahapatra, M.K.; Ghosh, S.; Saha, S.; Konar, M.C.; Sarkar, M.; Nandi, M. Role of lung ultrasound patterns in monitoring coronavirus disease 2019 pneumonia and acute respiratory distress syndrome in children. *Clin. Exp. Pediatr.* **2022**, *65*, 358–366. [\[CrossRef\]](#)
34. Tsabouri, S.; Makis, A.; Kosmeri, C.; Siomou, E. Risk Factors for Severity in Children with Coronavirus Disease 2019: A Comprehensive Literature Review. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2021**, *68*, 321–338. [\[CrossRef\]](#)
35. Zhou, B.; Yuan, Y.; Wang, S.; Zhang, Z.; Yang, M.; Deng, X.; Niu, W. Risk profiles of severe illness in children with COVID-19: A meta-analysis of individual patients. *Pediatr. Res.* **2021**, *90*, 347–352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Li, Y.; Deng, W.; Xiong, H.; Li, H.; Chen, Z.; Nie, Y.; Wang, Z.; Li, K.; Li, J. Immune-related factors associated with pneumonia in 127 children with coronavirus disease 2019 in Wuhan. *Pediatr. Pulmonol.* **2020**, *55*, 2354–2360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Eshkiki, Z.S.; Shahriari, A.; Seyedtabib, M.; Torabizadeh, M.; Assarehzadegan, M.A.; Nashibi, R.; Khosravi, M.; Neisi, N.; Mard, S.A.; Shayesteh, A.A. Innate and Adaptive Immunity Imbalance with Severe COVID-19 Pneumonia in Children and Adults. *Front. Pediatr.* **2021**, *9*, 736013. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Shafiek, H.K.; El Lateef, H.M.A.; Boraey, N.F.; Nashat, M.; Abd-Elrehim, G.A.B.; Abouzeid, H.; Hafez, S.F.M.; Shehata, H.; Elhewala, A.A.; Abdel-Aziz, A.; et al. Cytokine profile in Egyptian children and adolescents with COVID-19 pneumonia: A multicenter study. *Pediatr. Pulmonol.* **2021**, *56*, 3924–3933. [\[CrossRef\]](#)
39. Maggio, M.C.; Failla, M.C.; Giordano, S.; La Manna, M.P.; Sireci, G. Interleukin-6 Is a Promising Marker of COVID-19 in Children: A Case Series of 2 Brothers with Severe COVID-19 Pneumonia. *Am. J. Case Rep.* **2022**, *23*, e934468. [\[CrossRef\]](#)
40. Chidambaram, V.; Geetha, H.S.; Kumar, A.; Majella, M.G.; Sivakumar, R.K.; Voruganti, D.; Mehta, J.L.; Karakousis, P.C. Association of Lipid Levels with COVID-19 Infection, Disease Severity and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cardiovasc. Med.* **2022**, *9*, 862999. [\[CrossRef\]](#)

41. Ng, D.C.-E.; Tan, K.K.; Ting, G.S.S.; Ling, C.; Fadzilah, N.F.B.; Tan, S.F.; Subramaniam, T.; Zailanahuddin, N.E.B.; Lim, H.Y.; Baharuddin, S.B.; et al. Comparison of Severe Viral Pneumonia Caused by SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses among Malaysian Children During the COVID-19 Pandemic. *Front. Pediatr.* **2022**, *10*, 865099. [[CrossRef](#)]
42. Graff, K.; Smith, C.; Silveira, L.; Jung, S.; Curran-Hays, S.; Jarjour, J.; Carpenter, L.B.; Pickard, K.B.; Mattiucci, M.; Fresia, J.B.; et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2021**, *40*, e137–e145. [[CrossRef](#)]
43. Mania, A.; Faltin, K.; Mazur-Melewska, K.; Małecki, P.; Jończyk-Potoczna, K.; Lubarski, K.; Lewandowska, Z.; Cwalińska, A.; Rosada-Kurasińska, J.; Bartkowska-Śniatkowska, A.; et al. Clinical picture and risk factors of severe respiratory symptoms in COVID-19 in children. *Viruses* **2021**, *13*, 2366. [[CrossRef](#)]
44. Satdhabudha, A.; Chaiyakulsil, C.; Uppala, R.; Niyomkarn, W.; Tovichien, P.; Norasettekul, V.; Ruangnapa, K.; Smathakanee, C.; Choursamran, B.; Kulbun, A.; et al. Development and validation of the predictive score for pediatric COVID-19 pneumonia: A nationwide, multicenter study. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0273842. [[CrossRef](#)]
45. Marks, K.J.; Whitaker, M.; Agathis, N.T.; Anglin, O.; Milucky, J.; Patel, K.; Pham, H.; Kirley, P.D.; Kawasaki, B.; Meek, J.; et al. Hospitalization of Infants and Children Aged 0–4 Years with Laboratory-Confirmed COVID-19—COVID-NET, 14 States, March 2020–February 2022. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2022**, *71*, 429–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1: Laboratory results comparing patients who required any type of respiratory support with those who did not, and patients who required NIV and CMV with those who did not. The results are expressed as median and interquartile range [25-75].

Parameter	Patients who required any type of respiratory support (n=37)	Patients who DID NOT require respiratory support (n=7)	p-value	Patients who required NIV (n=11)	Patients who DID NOT require NIV (n=33)	p-value	Patients who required CMV (n=4)	Patients who DID NOT require CMV (n=40)	p-value
Hemoglobin; minimum (g/dL)	12.4 [10.8 – 14.6]	11.8 [10.8 – 13]	0.572	10.6 [9.4 – 12.2]	13 [11.5 – 14.6]	0.003	9.3 [9 – 10.3]	12.7 [11.4 – 14.5]	0.001
Platelets; minimum (x10 ³ /μL)	181 [163 – 226]	147 [121 – 321]	0.961	182 [168 – 227]	181 [135 – 234]	0.808	182 [92 – 258]	179 [140 – 226]	0.750
Leucocyte count; maximum (/mm ³)	9200 [6500 – 11400]	5600 [3800 – 8200]	0.021	10900 [7400 – 13000]	7700 [5500 – 10200]	0.118	11000 [4400 – 17000]	8050 [5800 – 10800]	0.547
Lymphocyte count; minimum (/mm ³)	800 [550 – 1400]	1600 [600 – 2000]	0.037	600 [400 – 900]	1100 [700 – 1600]	0.005	700 [150 – 1400]	850 [620 – 1500]	0.188
Neutrophile count; maximum (/mm ³)	6100 [3900 – 8000]	3000 [2200 – 5800]	0.003	7800 [5200 – 8600]	4800 [3050 – 6900]	0.110	6500 [2500 – 10100]	5700 [3200 – 7500]	0.841
C-reactive protein; maximum (mg/L)	49 [16 – 112]	17 [2.8 – 69]	0.046	63 [31 – 178]	35 [13 – 71]	0.192	46 [16 – 148]	39 [14 – 94]	0.988
Procalcitonin; maximum (ng/mL)	0.18 [0.06 – 0.57]	0.12 [0.05 – 0.62]	0.124	0.52 [0.31 – 1.64]	0.09 [0.06 – 0.38]	0.008	0.72 [0.36 – 1.26]	0.11 [0.06 – 0.54]	0.731
Ferritin; maximum (ug/L)	400 [190 – 1300]	263 [136 – 310]	0.258	819 [385 – 1952]	268 [189 – 742]	0.112	1990 [166 – 9400]	310 [190 – 1150]	0.002
LDH; maximum (IU/L)	840 [720 – 1090]	613 [589 – 949]	0.074	1086 [805 – 2123]	791 [589 – 1029]	0.006	1960 [1050 – 3100]	832 [612 – 1070]	0.132
IL-6; maximum (pg/mL)	32 [8.5 – 91]	20 [3 – 40]	0.191	43 [25 – 112]	11 [6 – 85]	0.379	71 [4.6 – 123]	28 [9 – 94]	0.458
PT; minimum (%)	76 [71 – 91]	85 [76 – 98]	0.351	75 [69 – 82]	81 [72 – 93]	0.130	79 [74 – 94]	79 [71 – 92]	0.700
aPTT; maximum (seconds)	26 [23 – 29]	28 [25 – 29]	0.494	25 [22 – 31]	26 [24 – 28]	0.830	28 [18 – 32]	26 [24 – 29]	0.945
INR; maximum	1.13 [1.04 – 1.21]	1.11 [1.01 – 1.19]	0.443	1.18 [1.08 – 1.29]	1.11 [1.03 – 1.15]	0.113	1.10 [0.9 – 1.20]	1.13 [1.05 – 1.23]	0.381
Fibrinogen; maximum (g/L)	5.3 [4.6 – 6.5]	4.5 [3.9 – 6]	0.605	5.1 [4.4 – 6.8]	4.9 [4.5 – 6.1]	0.969	4.3 [3.7 – 5.5]	5 [4.6 – 6.7]	0.069
D-dimer;	1 [0.6 – 2.1]	0.42 [0.39 – 1.92]	0.162	1.2 [0.8 – 2.4]	0.75 [0.42 – 1.8]	0.687	2.1 [1.1 – 3.4]	0.89 [0.58 – 1.86]	0.750

LDL cholesterol; average (mg/dL)	86 [64 – 101]	56 [44 – 120]	0.252	89 [65 – 105]	77 [52 – 95]	0.718	105 [90 – 132]	81 [56 – 91]	0.115
VLDL cholesterol; average (mg/dL)	23 [15 – 47]	15 [14 – 20]	0.009	25 [15 – 55]	19 [12 – 38]	0.585	30 [28 – 52]	19 [14 – 35]	0.478

NIV : non-invasive ventilation, CMV : conventional mechanical ventilation, CRP : C-reactive protein, PCT : procalcitonin, LDH : lactate dehydrogenase, IL-6 : interleukin-6, PT : prothrombin time, aPTT : activated partial thromboplastin time, INR : international normalized ratio, NT-ProBNP: N-terminal pro brain natriuretic peptide, CK : creatin kinase, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase, HDL cholesterol : high-density lipoprotein cholesterol, LDL cholesterol : low-density lipoprotein cholesterol, VLDL cholesterol : very low-density lipoprotein cholesterol.

Table S2: Evaluation of potential risk factors associated with greater severity: admission to the PICU, need for NIV and need for CMV. The results are expressed as counts and percentages (in parenthesis).

Risk factor	Patients ADMITTED to the PICU (n=13)	Patients NOT admitted to the PICU (n=31)	Odds Ratio [95% CI]	p-value	Patients who required NIV (n=11)	Patients who DID NOT required NIV (n=33)	Odds Ratio [95% CI]	p-value	Patients who required CMV (n=4)	Patients who DID NOT required CMV (n=40)	Odds Ratio [95% CI]	p-value
Gender (males)	9 (69.2%)	17 (54.8%)	0.54 [0.13 – 2.13]	0.376	7 (63.6%)	19 (57.6%)	0.77 [0.18 – 3.17]	1	3 (75%)	23 (57.5%)	0.45 [0.04 – 4.72]	0.634
Gender (females)	4 (30.8%)	14 (45.2%)			4 (36.4%)	14 (42.4%)			1 (25%)	17 (42.5%)		
Age <12 years old	6 (46.2%)	10 (32.3%)	0.55 [0.14 – 2.09]	0.496	5 (45.5%)	11 (33.3%)	0.6 [0.14 – 2.4]	0.492	3 (75%)	13 (32.5%)	0.16 [0.01 – 1.69]	0.129
Age ≥12 years old	7 (53.8%)	21 (67.7%)			6 (54.5%)	22 (66.7%)			1 (25%)	27 (67.5%)		
Presence of comorbidities	11 (84.6%)	25 (80.6%)	1.32 [0.22 – 7.59]	1	9 (81.8%)	27 (81.8%)	1 [0.17 – 5.86]	1	4 (100%)	32 (80%)		1
Obesity / Overweight	3 (23.1%)	10 (32.3%)	0.63 [0.14 – 2.8]	0.722	2 (18.2%)	11 (33.3%)	0.44 [0.08 – 2.4]	0.461	0	13 (32.5%)		
Recurrent wheezing / Asthma	1 (7.7%)	12 (38.7%)	0.13 [0.01 – 1.14]	0.068	1 (9.1%)	12 (36.4%)	0.17 [0.02 – 1.54]	0.132	0	13 (32.5%)		
Other pulmonary disease	4 (30.8%)	6 (19.4%)	1.85 [0.42 – 8.11]	0.449	4 (36.4%)	6 (18.2%)	2.57 [0.56 – 11.6]	0.237	2 (50%)	8 (20%)	4 [0.48 – 32.9]	0.218
Other neurological disorder	2 (15.4%)	7 (22.6%)	0.62 [0.11 – 3.5]	0.703	1 (9.1%)	8 (24.2%)	0.31 [0.03 – 2.83]	0.411	0	9 (22.5%)		
Prematurity ≤ 34 GA	4 (30.8%)	1 (3.2%)	13.3 [1.3 – 134.9]	0.022	4 (36.4%)	1 (3%)	18.2 [1.7 – 189.6]	0.010	3 (75%)	2 (5%)	57 [3.9 – 825]	0.003
Neuromuscular disorder	3 (23.1%)	1 (3.2%)	9 [0.83 – 96.6]	0.071	2 (18.2%)	2 (6.1%)	3.4 [0.42 – 28]	0.256	0	4 (10%)		
Immunodeficiency	2 (15.4%)	2 (6.5%)	2.6 [0.33 – 21.1]	0.570	1 (9.1%)	3 (9.1%)	1 [0.93 – 10.7]	1	1 (25%)	3 (7.5%)	4.1 [0.32 – 52.6]	0.327
Nephropathy	1 (7.7%)	2 (6.5%)	1.2 [0.1 – 14.6]	1	0	3 (9.1%)			0	3 (7.5%)		
Down syndrome	1 (7.7%)	2 (6.5%)	1.2 [0.1 – 14.6]	1	1 (9.1%)	2 (6.1%)	1.55 [0.1 – 18.9]	1	1 (25%)	2 (5%)	6.33 [0.43 – 91.7]	0.254
Cerebral palsy	1 (7.7%)	1 (3.2%)	2.5 [0.14 – 43.2]	0.508	1 (9.1%)	1 (3%)	3.2 [0.18 – 55.9]	0.442	0	2 (5%)		
Cardiopathy	1 (7.7%)	1 (3.2%)	2.5 [0.14 – 43.2]	0.508	1 (9.1%)	1 (3%)	3.2 [0.18 – 55.9]	0.442	0	2 (5%)		

Diabetes mellitus	2 (15.4%)	0				1 (9.1%)	1 (3%)	3.2 [0.18 – 55.9]	0.442	1 (25%)	1 (2.5%)	13 [0.64 – 263.8]	0.175
Other metabolic disorder	1 (7.7%)	1 (3.2%)	2.5 [0.14 – 43.2]	0.508	1 (9.1%)	1 (3%)	3.2 [0.18 – 55.9]	0.442	1 (25%)	1 (2.5%)	13 [0.64 – 263.8]	0.175	
Other diseases	6 (46.2%)	12 (38.7%)	1.3 [0.36 – 5]	0.647	4 (36.4%)	14 (42.4%)	0.77 [0.18 – 3.17]	1	1 (25%)	17 (42.5%)	0.45 [0.43 – 4.7]	0.634	
Time until diagnosis ≤2 days (n=30)	7 (23.3%)	23 (76.6%)	2.46 [0.63 – 9.55]	0.288	5 (16.7%)	25 (83.3%)	3.7 [0.89 – 15.6]	0.132	2 (6.7%)	28 (93.3%)	2.33 [0.29 – 18.5]	0.581	
Time until diagnosis >2 days (n=14)	6 (42.9%)	8 (57.1%)			6 (42.9%)	8 (57.1%)			2 (14.3%)	12 (85.7%)			
Time until admission ≤6 days (n=25)	10 (40%)	15 (60%)	0.28 [0.06 – 1.22]	0.081	8 (32%)	17 (68%)	0.39 [0.09 – 1.77]	0.301	4 (16%)	21 (84%)		0.122	
Time until admission >6 days (n=19)	3 (15.8%)	16 (84.2%)			3 (15.8%)	16 (84.2%)			0	0			
Viral coinfection	3 (23.1%)	2 (6.4%)	3 [0.37 – 24.17]	0.347	3 (27.2%)	2 (6.1%)	3 [0.37 – 24.17]	0.347	2 (50%)	3 (18.8%)	4.3 [0.4 – 44.4]	0.249	
Bacterial coinfection	3 (23.1%)	1 (3.2%)		1	3 (27.2%)	1 (3%)	1 [0.4 – 24.5]	1	2 (50%)	2 (5%)	1 [0.63 – 15.9]	1	

PICU : pediatric intensive care unit, NIV : non-invasive ventilation, CMV : conventional mechanical ventilation, GA : gestational age.

Table S3: Differences of the patients regarding SARS-CoV-2 variant periods: Wuhan period (March 2020-February 2021), Alpha period (B.1.1.7; February 2021-June 2021), Delta period (B.1.617.1; June 2021 - December 2021) and Omicron period (B.1.1.529; December 2021 - March 2022). The results are expressed as counts and percentages (in parenthesis).

Variable	Wuhan period (n=14)	Alpha period (n=7)	Delta period (n=11)	Omicron period (n=12)	p-value
Gender (males)	8 (57.1%)	5 (71.4%)	7 (63.6%)	6 (50%)	0.809
Gender (females)	6 (42.9%)	2 (28.6%)	4 (36.4%)	6 (50%)	
Age (<12 years old)	3 (21.4%)	2 (28.6%)	1 (9.1%)	10 (83.3%)	0.001
Age (≥12 years old)	11 (78.6%)	5 (71.4%)	10 (90.9%)	2 (16.7%)	
Presence of comorbidities	10 (71.4%)	7 (100%)	9 (81.8%)	10 (83.3%)	0.459
Obesity / Overweight	6 (42.9%)	2 (28.6%)	4 (36.4%)	1 (8.3%)	0.258
Recurrent wheezing / Asthma	3 (21.4%)	1 (14.3%)	4 (36.4%)	5 (41.7%)	0.509
Other pulmonary disease	3 (21.4%)	1 (14.3%)	2 (18.2%)	4 (33.3%)	0.754
Other neurological disorder	3 (21.4%)	3 (42.9%)	2 (18.2%)	1 (8.3%)	0.350
Prematurity ≤ 34 GA	1 (7.1%)	0	2 (18.2%)	2 (16.7%)	0.575
Neuromuscular disorder	2 (14.3%)	1 (14.3%)	1 (9.1%)	0	0.596
Immunodeficiency	3 (21.4%)	1 (14.3%)	0	0	0.164
Nephropathy	1 (7.1%)	1 (14.3%)	0	1 (8.3%)	0.690
Down syndrome	0	0	2 (18.2%)	1 (8.3%)	0.282
Cerebral palsy	0	0	1 (9.1%)	1 (8.3%)	0.589
Cardiopathy	0	0	0	2 (16.7%)	0.134
Diabetes mellitus	2 (14.3%)	0	0	0	0.213
Other metabolic disorder	0	1 (14.3%)	1 (9.1%)	0	0.349
Other diseases	6 (42.9%)	6 (85.7%)	1 (9.1%)	5 (41.7%)	0.015
Fever	14 (100%)	6 (85.7%)	9 (81.8%)	11 (91.7%)	0.434
Cough	9 (64.3%)	4 (57.1%)	9 (81.8%)	12 (100%)	0.085
Respiratory distress	10 (71.4%)	5 (71.4%)	10 (90.9%)	8 (66.7%)	0.558
Rhinorrhea	3 (21.4%)	2 (28.6%)	4 (36.4%)	10 (83.3%)	0.010
General malaise	5 (35.7%)	3 (42.9%)	7 (63.6%)	4 (33.3%)	0.446
Chest pain	4 (28.6%)	3 (42.9%)	4 (36.4%)	2 (16.7%)	0.614
Diarrhea	7 (50%)	3 (42.9%)	1 (9.1%)	1 (8.3%)	0.037
Headache	5 (35.7%)	2 (28.6%)	3 (27.3%)	0	0.162
Nausea/Vomiting	2 (14.3%)	1 (14.3%)	0	5 (41.7%)	0.069
Odynophagia	1 (7.1%)	0	5 (45.5%)	1 (8.3%)	0.020

Myalgia	3 (21.4%)	1 (14.3%)	2 (18.2%)	0	0.422
Abdominal pain	1 (7.1%)	1 (14.3%)	0	0	0.416
Anosmia / Ageusia	1 (7.1%)	0	0	0	0.533
CXR: Bilateral consolidation	6 (42.9%)	1 (14.3%)	8 (72.7%)	3 (25%)	0.005
CXR: Lobar consolidation	6 (42.9%)	2 (28.6%)	2 (18.2%)	7 (58.3%)	
CXR: Ground-glass opacities	2 (14.3%)	1 (14.3%)	1 (9.1%)	2 (16.7%)	
CXR: Interstitial opacities	0	3 (42.9%)	0	0	
Total hospital stay ≤5 days (n=22)	5 (22.7%)	4 (18.2%)	7 (31.8%)	6 (27.3%)	0.551
Total hospital stay >5 days (n=22)	9 (40.9%)	3 (13.6%)	4 (36.4%)	6 (27.3%)	
Admission to the PICU	4 (28.6%)	2 (28.6%)	4 (36.4%)	3 (25%)	0.945
Total PICU stay ≤5 days (n=9)	3 (33.3%)	2 (22.2%)	3 (44.4%)	1 (11.1%)	0.419
Total PICU stay >5 days (n=4)	1 (25%)	0	1 (25%)	2 (50%)	
Presenting complications	2 (14.3%)	1 (14.3%)	1 (9.1%)	4 (33.3%)	0.761
Need for respiratory support	11 (78.6%)	6 (85.7%)	10 (90.9%)	10 (83.3%)	0.868
Need for NIV	3 (21.4%)	1 (14.3%)	4 (36.4%)	3 (25%)	0.734
Need for CMV	1 (7.1%)	0	1 (9.1%)	2 (16.7%)	0.660
Treatment with steroids	8 (57.1%)	6 (85.7%)	9 (81.8%)	6 (50%)	0.232
Treatment with remdesivir	1 (7.1%)	1 (14.3%)	2 (18.2%)	3 (25%)	0.659
Treatment with immunomodulators	3 (21.4%)	0	1 (9.1%)	0	0.534

GA : gestational age, CXR : chest X-ray, PICU : pediatric intensive care unit, NIV : non-invasive ventilation, CMV : conventional mechanical ventilation.

4.3. Tercer estudio

El tercer estudio responde a los siguientes objetivos:

- 1.2. Describir los cuadros clínicos más graves: el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C).
- 1.3. Analizar el patrón de fiebre e inflamación que presentan los pacientes pediátricos con MIS-C y compararlo con otras entidades inflamatorias similares como la sepsis.
- 1.4. Diseñar una escala diagnóstica que distinga al ingreso a los pacientes con sospecha de MIS-C de los pacientes con sospecha de sepsis.

Hernández-García M, Roldán-Berengué E, Guitart C, Girona-Alarcón M, Argüello G, Pino R, F de Sevilla M, García-García JJ, Jordan I. Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and sepsis differentiation by a clinical and analytical score: MISSEP score. *European Journal of Pediatrics*. 2023 Nov;182(11):5109-5118. doi: 10.1007/s00431-023-05168-w. PMID: 37676491; PMCID: PMC10640430.

Resumen:

Introducción: El diagnóstico diferencial entre el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C) y otras causas de respuesta inflamatoria sistémica como la sepsis es complejo.

Objetivo: Evaluar las diferencias entre los pacientes con MIS-C y los pacientes con sepsis, todos ellos ingresados en una Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP), así como desarrollar una escala diagnóstica que distinga entre ambas entidades.

Material y métodos: Estudio retrospectivo que comparó datos demográficos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos de pacientes con MIS-C (cohorte 2020-2022) y pacientes con sepsis (cohortes 2010-2014 y 2017-2018) ingresados en la UCIP de un hospital de tercer nivel. Se desarrolló una escala diagnóstica con variables que diferenciaban bien ambas entidades.

Resultados: El estudio incluyó 29 pacientes diagnosticados de MIS-C, que fueron apareados con una ratio 1:3 con 87 pacientes diagnosticados de sepsis. Los pacientes con MIS-C eran mayores (10 *versus* 4 años) y la mayoría varones (69%). Las características clínicas que demostraron diferencias entre ambas patologías fueron la fiebre prolongada y signos y síntomas con afectación digestiva o cutáneo-mucosa. En los pacientes sépticos fue más frecuente observar leucocitosis, elevación de PCT y ferritina; mientras que en los pacientes con MIS-C fue más frecuente encontrar trombocitopenia, linfopenia y elevación de fibrinógeno y ADM (un biomarcador que se eleva en infecciones invasivas). Los pacientes con MIS-C presentaron mayor disfunción miocárdica de forma estadísticamente significativa.

Se seleccionaron cinco variables que mostraron diferencias entre las entidades y se incluyeron en una escala diagnóstica al que se denominó MISSEP: fiebre > 48 horas (20 puntos), trombocitopenia < $150 \times 10^3/\mu\text{L}$ (6 puntos), dolor abdominal (15 puntos), eritema conjuntival (11 puntos) y escala VIS (*Vasoactive Inotropic Score*) > 10 (7 puntos). La obtención en la escala de 25 o más puntos se asociaba al diagnóstico de MIS-C con una sensibilidad de 0.89 y una especificidad de 0.95.

Conclusiones: El fenotipo clínico de los pacientes con MIS-C fue muy similar al de los pacientes con sepsis. La escala diagnóstica MISSEP podría ser útil para distinguir entre ambas patologías y así ayudar a dirigir un tratamiento específico.



Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and sepsis differentiation by a clinical and analytical score: MISSEP score

María Hernández-García^{1,2} · Elies Roldan-Berengue³ · Carmina Guitart^{2,4} · Mònica Girona-Alarcón^{2,4} · Guillermo Argüello^{5,6} · Rosa Pino¹ · Mariona F. de Sevilla^{1,2,7,8} · Juan José García-García^{1,2,7,8} · Iolanda Jordan^{2,4,7,8}

Received: 2 May 2023 / Revised: 8 August 2023 / Accepted: 16 August 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Differential diagnosis between Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) and other causes of systemic inflammatory response such as sepsis is complex. The aims were to evaluate the differences between pediatric patients with MIS-C and sepsis and to develop a score to distinguish both entities. This was a retrospective study that compared demographic, clinical, diagnostic, and therapeutic data of pediatric patients with MIS-C (cohort 2020–2022) and sepsis (cohorts 2010–2014 and 2017–2018) admitted to a Pediatric Intensive Care Unit (PICU) of a tertiary care hospital. A diagnostic score was developed with variables that differentiated the two conditions. Twenty-nine patients with MIS-C were identified, who were matched 1:3 with patients with sepsis ($n = 87$). Patients with MIS-C were older (10 vs. 4 years old), and the majority were male (69%). Clinical characteristics that demonstrated differences were prolonged fever and signs and symptoms affecting skin-mucosa and gastrointestinal system. Leukocytes, PCT, and ferritin were higher in sepsis, while thrombocytopenia, lymphopenia, and elevated fibrinogen and adrenomedullin (biomarker with a role for the detection of invasive infections) were more frequent in MIS-C. MIS-C patients presented greater myocardial dysfunction ($p < 0.001$). Five criteria were selected and included in the MISSEP score after fitting them into a multivariate logistic regression model: fever > 48 hours (20 points), thrombocytopenia $< 150 \times 10^3/\mu\text{L}$ (6 points), abdominal pain (15 points), conjunctival erythema (11 points), and Vasoactive Inotropic Score (VIS) > 10 (7 points). The cutoff > 25 points allowed to discriminate MIS-C from sepsis with a sensitivity of 0.89 and specificity of 0.95.

Conclusion: MIS-C phenotype overlaps with sepsis. MISSEP score could be useful to distinguish between both entities and direct specific treatment.

What is Known:

- Differential diagnosis between Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) and other causes of systemic inflammatory response such as sepsis is complex.
- It is essential to establish an accurate initial diagnosis and early specific treatment in both cases of MIS-C and sepsis to improve the prognosis of these patients.

What is New:

- Patients with MIS-C are older and have characteristic symptoms of prolonged fever, gastrointestinal symptoms, skin-mucosal involvement, and greater myocardial dysfunction, compared to patients with sepsis.
- The use of diagnostic scores, such as the MISSEP score, can be very useful to distinguish between the two entities and help direct specific treatment.

Keywords MIS-C · Sepsis · COVID-19 · SARS-CoV-2 · Biomarkers · Diagnostic score

Abbreviations

ADM	MR-pro adrenomedullin
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
COVID-19	Coronavirus disease 2019
ESR	Erythrocyte sedimentation rate

Communicated by Tobias Tenenbaum

Extended author information available on the last page of the article

IL-6	Interleukin-6
LVEF	Left ventricular ejection fraction
MIS-C	Multisystem inflammatory syndrome in children
NT-ProBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
PCT	Procalcitonin
PICU	Pediatric intensive care unit
PRISM III score	Pediatric risk of mortality score III
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
STSS	Staphylococcal or streptococcal toxic shock syndrome
VIS	Vasoactive inotropic score
WHO	World Health Organization

Introduction

Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) is a post-infection complication occurring between 2 and 6 weeks after SARS-CoV-2 infection [1–4]. Although uncommon, being described as only appearing in <1% of children with confirmed SARS-CoV-2 infection, it can lead to admission to Pediatric Intensive Care Units (PICU) given its quick onset and worsening if not properly managed [1]. The clinical phenotype of MIS-C overlaps with other inflammatory conditions such as Kawasaki Disease, Sepsis, and Staphylococcal or streptococcal Toxic Shock Syndrome (STSS), which complicates differential diagnosis specially during the early stages of the disease, when establishing specific and early treatment is crucial [5–8].

Sepsis, one of those conditions which can mimic the manifestations of MIS-C, is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [9, 10]. It is a leading cause of morbidity and mortality in children worldwide, with an estimated incidence of 1.2 million cases per year [11]. Sepsis, as well as MIS-C, also presents with fever, elevated inflammatory biomarkers, hypotension or shock, coagulopathy, and multiorgan dysfunction [9]. The similarity of the clinical characteristics of both entities has led to a diagnostic challenge for physicians during this pandemic [12].

Moreover, it must be considered that MIS-C is a diagnosis of exclusion, which includes ruling out other bacterial causes of inflammation, such as sepsis. For this reason, all patients are initially treated with antibiotics as if for sepsis and, if MIS-C is suspected, they are given supportive therapies with intravenous immunoglobulin (IVIG) and intravenous methylprednisolone [13, 14].

Given the importance of establishing an accurate initial diagnosis and specific treatment in both MIS-C and sepsis cases, this retrospective study was conducted. The aims were to compare their epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic characteristics and to design a diagnostic score that helps to differentiate them and thus be able to initiate targeted treatment as soon as possible to improve their prognosis.

Materials and methods

This was a retrospective study that compared epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic data of pediatric patients (<19 years old) diagnosed with sepsis and MIS-C, admitted to the PICU of Sant Joan de Déu Hospital. This is a tertiary care level pediatric hospital with 345 beds (28 PICU beds) and estimated to manage the 20% of all annual hospitalizations in Catalonia (Spain). The objectives of the study were to compare the characteristics of patients with MIS-C and patients with sepsis and to design a diagnostic score that helps to differentiate both entities.

Our total sample consisted of 116 patients: from 29 patients with MIS-C we selected 87 patients with sepsis, resulting in a ratio of MIS-C to sepsis of 1:3 (since we only had 29 examples of MIS-C patients, we chose a ratio of 1:3 in order to have a sufficiently balanced data set with an adequate number of observations to fit a predictive model). The ratio of female to male in the MIS-C cohort was 1:2.2, so this ratio was replicated for the sepsis cohort. Pairing by age was tried but not achieved because the median age for MIS-C patients was greater.

The primary outcomes of the study were hours of fever at admission and cardiac dysfunction. These were selected based on their clinical importance for both sepsis and MIS-C according to previous studies. In addition, other secondary outcomes were also determined: epidemiological (age, gender, comorbidities, stay, outcome), clinical (signs and symptoms), diagnostic (other laboratory data at admission, echocardiographic cardiac dysfunction data), and therapeutic (requirement of inotropic support and/or fluid therapy).

MIS-C patients were diagnosed following the World Health Organization (WHO) classification criteria [15], which implies children and adolescents 0–19 years old, with prolonged fever (>3 days), elevated inflammatory biomarkers and two of the following: rash, conjunctivitis or mucocutaneous inflammation signs, hypotension or shock, cardiac dysfunction, coagulopathy, or gastrointestinal symptoms. The definition also includes the absence of other bacterial causes of inflammation (such as sepsis) as well as the evidence of previous SARS-CoV-2 infection (by RT-PCR, antigen test, or positive serology) or the history of contact with a COVID-19 patient. In the MIS-C cohort, exclusion criteria were being hospitalized but not admitted to the PICU and not requiring fluid therapy or inotropic support.

Sepsis patients were diagnosed based on International Pediatric Sepsis Consensus definition [9]. Sepsis is defined as a Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) as a result of suspected or proven infection. Severe sepsis is defined as a sepsis with cardiovascular organ dysfunction, acute respiratory distress syndrome, or two or more other organ dysfunctions. In the sepsis cohort, the exclusion criterion was having history of immunosuppression secondary to pathologies such as leukemia or immunosuppressive treatments like chemotherapy (given the alteration in laboratory data secondary to these conditions).

MIS-C patients were attended and prospectively recorded between 2020 and beginnings of 2022. All included sepsis patients had been admitted before the COVID-19 pandemic (2010–2014 and 2017–2018 cohorts) and had been included in a prospective database for different studies [16–18]. Patients with sepsis from the years 2020–2022 were not included because there was not enough sample in those years and also precisely to avoid confounding factors with the MIS-C group.

Regarding MIS-C patients, it was reported whether or not they had been vaccinated against SARS-CoV-2 before admission. However, it was not possible to differentiate whether the positive IgGs were secondary to natural infection or vaccination.

All the data of interest were extracted from electronic records entered by the pediatric critical care physicians who had attended each of the patients. No personally identifiable data was collected during the conduct of this study. Unfortunately, being a retrospective study, there was information on clinical or laboratory variables that was not collected in all patients.

Written informed consent was obtained from all patients or their legal guardians. The study was done in accordance with the Helsinki declaration and approved by the Sant Joan de Déu Ethical Assistant Committee (PIC-180–2).

Statistical analysis

Categorical variables were expressed as proportions while continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR). The comparison of categorical variables was performed using the Chi-Square test and Fisher's exact test; continuous variables were compared using the Student *t*-test. All tests were two-sided, and *p* values less than 0.05 were considered to indicate a statistically significant difference. Statistical analyses were done using SPSS, version 25.0.

One of our main objectives was to develop a diagnostic prediction model that could help distinguish patients with MIS-C and sepsis. Although the training data was manually built and there were not many missing values, we took missing values for categorical variables to mean the absence of the variable and imputed missing values in continuous variables with their class mean value. Before training the model, we applied the Boruta feature selection algorithm

[19] to select the most important predictors. Subsequently, with these variables, we trained a logistic regression, scaling the resulting regression coefficients, multiplying them by 100, and rounding to the nearest integer. The sum of all the scaled coefficients constituted a score that was our final outcome. Binary variables included in the model were coded as present or absent. Threshold selection was based on a ROC curve analysis, selecting the value at which sensitivity plus specificity were maximized. To overcome the limited amount of data, we used a tenfold cross-validation to validate model performance as recommended in [20] and l2-penalty to avoid overfitting [21]. We used precision, sensitivity (recall), and f1-score metrics to measure model performance, calculated as follows:

$$\text{precision} = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$f1 - \text{score} = \frac{2 * \text{precision} * \text{sensitivity}}{\text{precision} + \text{sensitivity}}$$

Results

Our total sample consisted of 116 patients: 29 patients with MIS-C and 87 patients with sepsis (ratio 1:3). The global median age was 5.5 years old (IQR 2.1–11.3), and most of them were male (69%). MIS-C patients were older (median 10 years; IQR 6.9–13.8) than sepsis patients (median 4 years; IQR 1.6–8.5). Sepsis patients had more frequently underlying medical conditions (31% vs. 7%; *p*=0.009). In comparison to sepsis patients, patients with MIS-C had shorter median hospital stay (8 vs. 13 days; *p*=0.007) and shorter PICU stay (3 vs. 6 days; *p*=0.008). Five patients died, all of them belonged to the sepsis group.

For patients diagnosed with MIS-C, the evidence of previous SARS-CoV-2 infection was documented. Of the 29 MIS-C patients, 29 (100%) had positive IgG serology (4 of them (14%) had been vaccinated against SARS-CoV-2 before admission), 10 (35%) had positive IgM serology, and just 5 out of 22 (23%) still had a positive SARS-CoV-2 PCR on admission.

Clinical data comparison

In terms of clinical variables, there was a considerable overlap between the signs and symptoms of both entities. Fever was the most frequent symptom; although it was present in 100% of MIS-C cases vs. 81% of sepsis cases

($p=0.006$), its duration on admission was notably shorter in sepsis cases (median 20 h vs. 96 h; $p<0.001$). Patients with MIS-C were more likely to have gastrointestinal symptoms such as abdominal pain (83% vs. 15%; $p<0.001$) and diarrhea (55% vs. 17%; $p<0.001$). The signs and symptoms that share similarity with Kawasaki disease were clearly

more frequent in patients with MIS-C: rash (48% vs. 24%; $p=0.01$), conjunctival erythema (45% vs. 1%; $p<0.001$), and muco-cutaneous inflammation such as odynophagia (28% vs. 2%; $p<0.001$) and oral ulcers (31% vs. 6%; $p=0.001$). All the epidemiological and clinical data of the patients are described in Table 1.

Table 1 Epidemiological and clinical data of interest comparing patients with sepsis and MIS-C

	Total ($n=116$)	Sepsis ($n=87$)	MIS-C ($n=29$)	p value
Epidemiological data				
Age (years old); median (IQR)	5.5 (2.1–11.3)	4 (1.6–8.5)	10 (6.9–13.8)	<0.001
Sex (males); n (%)	80 (69%)	60 (69%)	20 (69%)	1
Underlying medical condition; n (%)	29 (25%)	27 (31%)	2 (7%)	0.009
Evolution				
Hospital stay (days); median (IQR)	10.5 (8–17)	13 (8–20)	8 (5.5–10)	0.007
PICU stay (days); median (IQR)	4 (2–8)	6 (2–10)	3 (2–5)	0.008
Outcome (died); n (%)	5 (4%)	5 (6%)	0	0.32
PRISM III score; median (IQR)	5 (2–10.75)	7 (2–12.5)	4 (2–8)	0.04
Clinical data				
General clinical data				
Fever; n (%)	99 (85%)	70 (81%)	29 (100%)	0.006
Hours of fever at admission; median (IQR)	24 (16–48)	20 (12–30)	96 (72–144)	<0.001
Bad general condition; n (%)	54 (47%)	44 (51%)	10 (35%)	0.13
Asthenia; n (%)	15 (13%)	8 (9%)	7 (24%)	0.05
Myalgias; n (%)	7 (6%)	1 (1%)	6 (21%)	0.001
Cervical adenopathy; n (%)	5 (4%)	2 (2%)	3 (10%)	0.09
Gastrointestinal data				
Abdominal pain; n (%)	37 (32%)	13 (15%)	24 (83%)	<0.001
Diarrhea; n (%)	31 (27%)	15 (17%)	16 (55%)	<0.001
Vomiting; n (%)	50 (43%)	34 (39%)	16 (55%)	0.13
Anorexia; n (%)	17 (15%)	12 (14%)	5 (17%)	0.76
Constipation; n (%)	4 (3%)	1 (1%)	3 (10%)	0.04
Respiratory data				
Cough; n (%)	43 (37%)	34 (39%)	9 (31%)	0.43
Rhinorrhea; n (%)	37 (32%)	34 (39%)	3 (10%)	0.004
Dyspnea; n (%)	41 (35%)	32 (37%)	9 (31%)	0.57
Dermatological/muco-cutaneous data				
Rash; n (%)	35 (30%)	21 (24%)	14 (48%)	0.01
Odynophagia; n (%)	10 (9%)	2 (2%)	8 (28%)	<0.001
Oral ulcers; n (%)	14 (12%)	5 (6%)	9 (31%)	0.001
Limb edema; n (%)	13 (11%)	9 (10%)	4 (14%)	0.73
Conjunctival erythema; n (%)	14 (12%)	1 (1%)	13 (45%)	<0.001
Cardiovascular data				
Tachycardia; n (%)	90 (78%)	67 (77%)	23 (79%)	0.79
Hypotension; n (%)	82 (71%)	57 (66%)	25 (86%)	0.03
Oliguria; n (%)	26 (22%)	16 (18%)	10 (35%)	0.07
Neurologic data				
Altered level of consciousness; n (%)	27 (23%)	25 (29%)	2 (7%)	0.01
Headache; n (%)	18 (16%)	10 (12%)	8 (28%)	0.07
Irritability; n (%)	11 (10%)	10 (12%)	1 (3%)	0.28

All the data indicated in bold are values of $p < 0.05$ that are considered statistically significant

PICU pediatric intensive care unit, PRISM III score pediatric risk of mortality score III

Analytical data comparison

Compared with patients with MIS-C, patients with sepsis had a higher leukocyte count (12,800/mm³ vs. 9600/mm³; $p=0.01$), whereas thrombocytopenia ($119 \times 10^3/\mu\text{L}$

vs. $225 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p=0.001$) and lymphopenia (800/mm³ vs. 1600/mm³; $p=0.02$) were more common in patients with MIS-C. In terms of inflammatory biomarkers, procalcitonin (17.5 ng/mL vs. 8.4 ng/mL; $p=0.01$) and ferritin (1096 $\mu\text{g/L}$ vs. 944 $\mu\text{g/L}$; $p=0.001$) were higher in sepsis,

Table 2 Diagnostic and therapeutic data of interest comparing patients with sepsis and MIS-C

	Total ($n=116$)	Sepsis ($n=87$)	MIS-C ($n=29$)	p value
Laboratory data (at admission)				
Hemogram parameters				
Leukocyte count (/mm ³); median (IQR)	12,500 (6200–18,200)	12,800 (6900–21,725)	9600 (5600–13,350)	0.01
Lymphocyte count (/mm ³); median (IQR)	1200 (600–2500)	1600 (725–2754)	800 (400–1250)	0.02
Neutrophil count (/mm ³); median (IQR)	7200 (3600–13,700)	7300 (3075–14,075)	6700 (4000–11,700)	0.97
Platelet count ($\times 10^3/\mu\text{L}$); median (IQR)	194 (113–305)	225 (157–351)	119 (100–178)	0.001
Coagulation parameters				
Prothrombin time (%); median (IQR)	60.2 (47.5–72.5)	58.7 (45.5–71.3)	64.7 (51.7–80.25)	0.20
Partial thromboplastin time (seconds); median (IQR)	30.2 (26.5–34.8)	30.3 (27.4–36)	28.5 (24.9–33.1)	0.06
Fibrinogen (g/L); median (IQR)	5.1 (4.45–6.45)	4.6 (4.05–5.85)	6.4 (4.9–7.2)	0.001
D-dimer (mg/L); median (IQR)	**	**	6.25 (3.29–8.14)	**
Biochemical parameters				
Glucose (mg/dL); median (IQR)	101 (84–131)	98.5 (80.5–121)	137 (122–178)	0.02
Creatinine (mg/dL); median (IQR)	0.58 (0.44–0.75)	0.53 (0.39–0.75)	0.63 (0.56–0.75)	0.35
Urea (mg/dL); median (IQR)	26.3 (19–42.9)	26 (17–43.8)	26.9 (21.9–42.5)	0.63
ALT (UI/L); median (IQR)	22 (15–48)	20.5 (12–42.5)	40 (20–51.5)	0.81
AST (UI/L); median (IQR)	33 (24–52)	30 (18–52.7)	39 (28.5–52.5)	0.57
Total bilirubin (mg/dL); median (IQR)	11.6 (9.1–19.7)	12.7 (9.5–19.9)	9.8 (7.3–19.2)	0.83
Conjugated bilirubin (mg/dL); median (IQR)	7.1 (5.3–9.6)	7.3 (4.1–8.2)	7.1 (5.4–11.2)	0.56
Protein (g/L); median (IQR)	56 (51–64)	55 (46–64.5)	58 (53–62.5)	0.83
Albumin (g/L); median (IQR)	26 (22–30.3)	26.5 (23–31.8)	25.5 (20.8–29)	0.35
ESR (mm); median (IQR)	13 (4.8–30)	7 (3.3–26.5)	18 (6.5–31.8)	0.19
C-reactive protein (mg/L); median (IQR)	136.8 (51.2–244)	87 (39.3–215.3)	230.9 (156.2–295.3)	0.41
Procalcitonin (ng/mL); median (IQR)	11.7 (2–43.8)	17.5 (1.7–49.8)	8.4 (2.4–16.9)	0.01
Lactate (mmol/L); median (IQR)	2.15 (1.48–3.2)	1.9 (1.3–3.08)	2.75 (1.78–3.33)	0.38
Adrenomedullin (nmol/L); median (IQR)	1.53 (0.94–2.82)	1.47 (0.86–3.45)	1.72 (1.26–2.40)	0.01
Ferritin ($\mu\text{g/L}$); median (IQR)	1008.3 (366.2–1748.3)	1096.9 (360.8–3829.8)	944.6 (369.9–1479.1)	0.001
IL-6 (pg/mL); median (IQR)	**	**	158 (61–552)	**
Ionogram parameters				
Sodium (mmol/L); median (IQR)	137 (135–140)	137 (135–141)	135 (132–138)	0.003
Potassium (mmol/L); median (IQR)	3.8 (3.4–4)	3.8 (3.4–4.1)	3.7 (3.5–4)	0.70
Chlorine (mmol/L); median (IQR)	106 (102–111)	107 (103–111)	102 (99–108)	0.08
Calcium (mmol/L); median (IQR)	1.18 (1.09–1.24)	1.16 (1.07–1.23)	1.19 (1.16–1.27)	0.01
Cardiovascular affection (diagnostic and therapeutic)				
Troponin (ng/mL); median (IQR)	0.068 (0.010–0.830)	0.010 (0.000–0.770)	0.082 (0.014–0.906)	0.44
NT-ProBNP (ng/L); median (IQR)	6839 (4114–21,501)	13,169 (3089–23,250)	6839 (4208–19,167)	0.71
Creatine kinase (UI/L); median (IQR)	70.5 (35.5–282.8)	115 (40.5–346)	59 (33–94)	0.30
Cardiac dysfunction (LVEF < 50%); n (%)	25/116 (22%)	11/87 (13%)	14/29 (48%)	<0.001
Requirement of inotropic support; n (%)	72/116 (62%)	53/87 (61%)	19/29 (66%)	0.65
VIS; median (IQR)	12 (8–25)	10 (8.5–26)	15 (8–25)	0.55

All the data indicated in bold are values of $p < 0.05$ that are considered statistically significant

ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, ESR erythrocyte sedimentation rate, IL-6 interleukin-6, NT-ProBNP N-terminal pro-brain natriuretic peptide, LVEF left ventricular ejection fraction, VIS vasoactive inotropic score

**Missing values

while fibrinogen (6.4 g/L vs. 4.6 g/L; $p=0.001$) and adrenomedullin (1.72 nmol/L vs. 1.47 nmol/L; $p=0.01$) were higher in MIS-C. Regarding cardiovascular affection, despite the fact that no significant differences were found in cardiac biomarkers, it was observed that patients with MIS-C presented more cardiac dysfunction on echocardiography (left ventricular ejection fraction, LVEF < 50%: 48% vs. 13%; $p < 0.001$). All the diagnostic and therapeutic data are described in Table 2.

Diagnostic score

We designed a diagnostic score named MISSEP score, after the conjunction of the words MIS-c and SEPs. Feature selection algorithm resulted in the selection of five variables that distinguished well between both conditions in previous exposed analysis: hours of fever, platelets, abdominal pain (1 if experienced by the patient, 0 otherwise), conjunctival erythema (1 if experienced by the patient, 0 otherwise), and need for vasoactive drugs (measured as Vasoactive Inotropic Score; VIS). We fitted a multivariate logistic regression model using these five variables and then scaled the regression coefficients to integer values to build the final score (see Table 3).

From a clinical perspective, the score would tell us that MIS-C patients compared to those with sepsis present with more hours of fever, have a lower platelet count, are more likely to have abdominal pain and conjunctival erythema, and have higher VIS values (increased need for inotropic/vasoactive treatment) (see Fig. 1).

We fitted the regression using the whole data set, with a ten-fold cross-validation yielding 0.89, 0.86, and 0.88 for precision, sensitivity, and f1-score metrics respectively for MIS-C class and equivalently 0.95, 0.97, and 0.96 for the sepsis class.

Discussion

Our study assesses the similarities and differences of pediatric patients admitted to the PICU with diagnoses of MIS-C and sepsis. In addition, it provides a diagnostic score: the MISSEP score, named after the conjunction of the words MIS-c and SEPs. It includes five relevant clinical, laboratory, and therapeutic variables, such as hours of fever,

platelets, abdominal pain, conjunctival erythema, and need for vasoactive drugs, whose values have shown differences that make it possible to distinguish between both entities. In order to optimize the management of patients with MIS-C, other authors have proposed diagnostic scores with the aim to be a guide for physicians to help differentiate MIS-C from other conditions [5, 22]. However, as far as we know, to date no score has been designed to help differentiate MIS-C from sepsis. We believe that the MISSEP score distinguishes well between both entities, with high sensitivity and specificity, and that despite being a diagnostic score, secondarily it can also help direct the specific treatment of each of the entities, starting it early and thus improving the prognosis of these patients. From a clinical point of view, the score determines that patients with MIS-C, compared to those with sepsis, present with more hours of fever, have a lower platelet count, and are more likely to have abdominal pain and conjunctival erythema, as well as an increased need for inotropes (measured by the VIS score). Although the score has been validated internally, future external validation with a larger number of patients may improve its application.

The clinical phenotype of MIS-C overlapping with other inflammatory conditions such as COVID-19, Kawasaki disease, and STSS has led to a diagnostic challenge for physicians during this pandemic [5, 6, 8, 22, 23]. The same similarities in the clinical characteristics and laboratory biomarkers have been observed with sepsis, an entity with a higher incidence, and which is related to considerably higher morbidity and mortality in the pediatric population [11, 24]. While COVID-19 and MIS-C have justifiably dominated the attention of the scientific literature for the past 3 years, the incidence of sepsis has continued to outpace the cases of severe SARS-CoV-2-related conditions in children [12]. The importance of knowing how to differentiate MIS-C and sepsis lies in the fact that each one has a different pathophysiology and therefore each one needs a specific treatment.

From an epidemiological point of view, it has been described that sepsis has a higher incidence in patients under 5 years of age, especially in neonates [25]. On the contrary, although it is true that cases of a multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 have been described in neonates [26], MIS-C typically occurs in older children, around 5–15 years old [1–3]. In our cohort, patients with

Table 3 Variables included in the score calculation, beta values of the logistic regression, and the points of each variable for scoring

Variable	β	<i>p</i> value	Number of points (criteria for scoring)
Fever (≤ 48 hours)	2.0067	<0.001	0 (≤ 48 hours of fever) or 20 (> 48 hours of fever)
Thrombocytopenia (platelets $< 150 \times 10^3/\mu\text{L}$)	0.574	<0.001	0 (no) or 6 (yes)
Abdominal pain	1.461	<0.001	0 (no) or 15 (yes)
Conjunctival erythema	1.057	<0.001	0 (no) or 11 (yes)
Vasoactive Inotropic Score (VIS)	0.657	<0.001	0 ($\text{VIS} \leq 10$) or 7 ($\text{VIS} > 10$)

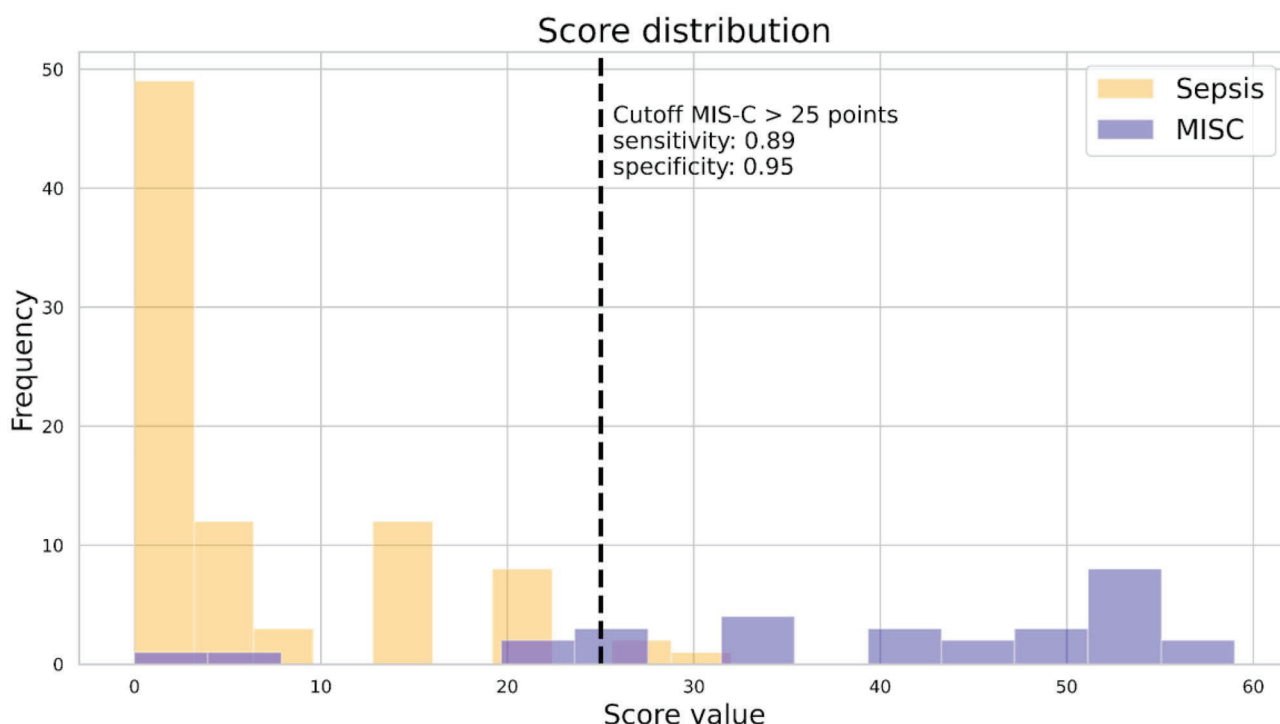


Fig. 1 Score distribution of all available patients. Sepsis patients are shown in yellow and MIS-C patients in blue. Dashed line shows the cutoff point. Sensitivity of the model: 0.89 and specificity: 0.95

MIS-C were characteristically older compared with patients with sepsis. On the other hand, patients with MIS-C do not usually have previous comorbidities; however, in patients with sepsis, as observed in our study, the presence of comorbidities has been described in up to 30–50% of cases [11]. In addition, in relation to the greater severity associated with sepsis, in our cohort we observed that these patients had greater morbidity (longer hospital and PICU stay) and mortality, in comparison to MIS-C patients.

Considering the standardized definitions of MIS-C and sepsis, overlaps have been observed in their diagnostic criteria: the presence of fever, elevated inflammatory biomarkers, hemodynamic dysfunction, and other organ dysfunctions are common in both entities [9, 15]. Fever, the guiding symptom of MIS-C, present in 100% of MIS-C cases in our cohort, usually lasts several days in these patients [1, 3, 27]. However, in cases of sepsis, fever is not a *sine qua non* condition, in fact, hypothermia can occur, although characteristically when fever is present in septic patients it has a very acute onset, lasting a few hours [9]. In our cohort, there was a statistically significant difference in the duration of fever at admission between both entities, being the duration of fever in cases of sepsis much shorter (20 hours vs. 96 hours).

Both MIS-C and sepsis are associated with hyperinflammation, and both have the potential to develop multi-organ dysfunction. As described in the literature and observed in our study, in MIS-C gastrointestinal symptoms predominate,

as well as Kawasaki-like symptoms and signs with skin and mucosa involvement, such as odynophagia, oral ulcers, rash, and conjunctival erythema [1–3, 27].

Regarding biomarkers, characteristic alterations described in the literature to be observed in practically all patients with MIS-C are thrombocytopenia, lymphopenia, and hypoalbuminemia, as well as elevation of C-reactive protein, fibrinogen, D-dimer, and ferritin [28]. Some authors have tried to find patterns of specific inflammatory markers that could distinguish MIS-C from other hyperinflammatory syndromes, such as COVID-19 [29], Kawasaki disease, and macrophage activation syndrome [30]. For instance, Diaz et al. further developed the central role of IL-6, as IL-6 inhibitors prescribed as immunomodulators in cases refractory to standard therapy turned out to be effective. They compared the plasma concentration of IL-6 between critically ill children with MIS-C and sepsis, noting that the concentration of IL-6 rose much more in patients with sepsis than in patients with MIS-C [31]. In our study, in addition to the laboratory abnormalities usually observed in these patients, we compared two other biomarkers: procalcitonin (PCT) and MR-pro adrenomedullin (ADM), two biomarkers that have previously shown utility in the diagnosis of sepsis [17, 32]. PCT is a widely used biomarker in daily clinical practice, having been shown to be specific for acute bacterial infections, and ADM is a relatively new biomarker that has also been proposed as a good tool for the detection of invasive infections. We found that PCT was increased with a statistically significant difference in

the sepsis group, compared to the MIS-C group. However, the opposite occurred with ADM, which was statistically significantly higher in the MIS-C group.

As regards with the hemodynamic involvement, in our study we observed that patients with MIS-C had greater myocardial dysfunction at the echocardiographic level (left ventricular ejection fraction; LVEF < 50%), compared to the sepsis group. In addition, patients with MIS-C had a greater need for inotropes, although without showing statistically significant differences. Other authors have demonstrated the usefulness of the early determination of hemodynamic involvement in MIS-C patients, in order to assess starting inotropic/vasoactive support as soon as necessary and, therefore, to improve prognosis [33, 34].

Another key point to note is that the definition of MIS-C includes ruling out other bacterial causes of inflammation, such as sepsis. Given the similarity of patients with MIS-C and sepsis and knowing that the mortality of the latter increases as the time until the start of effective antimicrobial therapy increases, the guidelines recommend that all patients with suspected MIS-C and signs of shock or organ dysfunction should be treated empirically with broad-spectrum intravenous antimicrobial therapy until bacterial sepsis is ruled out [14]. This is a debatable fact, since antibiotics are not necessary in most patients with MIS-C. Some authors have recorded the use of antibiotics in these patients, determining an administration rate of up to 90% [35, 36]. Guidelines, in addition to recommend starting the use of antibiotics, also recommend carrying out a daily evaluation (with clinical and laboratory data) to assess de-escalating or stopping them based on the clinical course, microbiological findings, and the presence of other clear diagnostic criteria in favor of MIS-C [14]. This misuse of antibiotics can lead to an increase in bacterial resistance, a growing global health problem, which is why it is necessary to evaluate the need for antibiotic therapy in all patients with MIS-C.

Limitations

The present study has several limitations. First, the small sample size may have generated low-quality statistical results. In addition, the fact that the cohorts of patients with sepsis and MIS-C are from different years may have generated biases. Finally, being a retrospective study, there is information on clinical variables that could not be known, as well as laboratory variables, not collected in all patients.

Conclusions

Patients with MIS-C who require admission to the PICU have many common characteristics with patients with sepsis, an entity with a higher incidence and associated morbidity and

mortality. Having tools to distinguish both entities can optimize the management of these patients. In our study, patients with MIS-C were older and had characteristic symptoms of prolonged fever, gastrointestinal symptoms, skin-mucosal involvement, and greater myocardial dysfunction, compared to patients with sepsis. The use of diagnostic scores, such as the MISSEP score, can be very useful to distinguish between the two entities and help direct specific treatment, improving the prognosis of these patients. Future studies with a larger number of patients may improve the application of the MISSEP score.

Acknowledgements We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

Authors’ contributions Dr. María Hernández-García conceptualized and designed the study, drafted the initial manuscript, and critically reviewed and revised the manuscript. Elies Roldan-Berengue and Guillermo Argüello designed the data collection instruments, collected data, carried out the initial analyses, and critically reviewed and revised the manuscript. Drs. Carmina Guitart, Mònica Girona-Alarcón, and Iolanda Jordan conceptualized and designed the study, coordinated and supervised data collection, and critically reviewed and revised the manuscript for important intellectual content. Drs. Rosa Pino, Mariona F. de Sevilla, and Juan José García-García critically reviewed and revised the manuscript. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

Data availability The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to individual privacy could be compromised, but are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval The study was done in accordance with the Helsinki declaration and approved by the Sant Joan de Déu Ethical Assistant Committee (PIC-180-2).

Consent to participate All participants or their legal guardians (of those participants under 16 years old) provided a written informed consent.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Hoste L, Van Paemel R, Haerynck F (2021) Multisystem inflammatory syndrome in children related to COVID-19: a systematic review. *Eur J Pediatr* [Internet] 180(7):2019–2034. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-03993-5>
- Lee KH, Li H, Lee MH, Park SJ, Kim JS, Han YJ et al (2022) Clinical characteristics and treatments of multi-system inflammatory syndrome in children: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2022 May [cited 2022 Aug 25];26(9):3342–50. https://doi.org/10.26355/eurrev_202205_28754
- Abrams JY, Godfred-Cato SE, Oster ME, Chow EJ, Koumans EH, Bryant B et al (2020) Multisystem inflammatory syndrome in children associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: a systematic review. *J Pediatr* [Internet] 1(226):45–54. e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.08.003>
- Whittaker E, Bamford A, Kenny J, Kaforou M, Jones CE, Shah P et al (2020) Clinical characteristics of 58 children with a pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2. *JAMA* [Internet] 324(3):259. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.10369>
- Godfred-Cato S, Abrams JY, Balachandran N, Jaggi P, Jones K, Rostad CA et al (2022) Distinguishing multisystem inflammatory syndrome in children from COVID-19, Kawasaki disease and toxic shock syndrome. *Pediatr Infect Dis J* [Internet] 41(4):315–323. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003449>
- Sancho-Shimizu V, Brodin P, Cobat A, Biggs CM, Toubiana J, Lucas CL et al (2021) SARS-CoV-2-related MIS-C: a key to the viral and genetic causes of Kawasaki disease? *J Exp Med* [Internet]. 218(6). <https://doi.org/10.1084/jem.20210446>
- Sudeep KC, Awasthi P, Kumar S, Angurana SK, Nallasamy K, Angrup A et al (2022) MIS-C mimickers: a case series of bacterial enteritis and sepsis mistaken as MIS-C. *Indian J Pediatr* [Internet]. 89(2):206–206. <https://doi.org/10.1007/s12098-021-04019-6>
- Cherqaoui B, Koné-Paut I, Yager H, Le BF, Piram M (2021) Delineating phenotypes of Kawasaki disease and SARS-CoV-2-related inflammatory multisystem syndrome: a French study and literature review. *Rheumatology* [Internet] 60(10):4530–4537. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab026>
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A (2005) International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics*. *Pediatr Crit Care Med* [Internet] 6(1):2–8. <https://doi.org/10.1097/01.PCC.0000149131.72248.E6>
- Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP et al (2020) Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Pediatr Crit Care Med* [Internet] 21(2):e52–106. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000002198>
- Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N (2018) The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med* [Internet] 6(3):223–230. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30063-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30063-8)
- Weiss SL, Peters MJ, Agus MSD, Alhazzani W, Choong K, Flori HR et al (2020) Perspective of the surviving sepsis campaign on the management of pediatric sepsis in the era of coronavirus disease 2019*. *Pediatr Crit Care Med* [Internet] 21(11):e1031–e1037. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000002553>
- Henderson LA, Canna SW, Friedman KG, Gorelik M, Lapidus SK, Bassiri H et al (2022) American College of Rheumatology clinical guidance for multisystem inflammatory syndrome in children associated with SARS-CoV-2 and hyperinflammation in pediatric COVID-19: version 3. *Arthritis Rheumatol* [Internet] 74(4):e1–20. <https://doi.org/10.1002/art.42062>
- Schlapbach LJ, Andre MC, Grazioli S, Schöbi N, Ritz N, Aebi C et al (2021) Best practice recommendations for the diagnosis and management of children with pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2 (PIMS-TS; multisystem inflammatory syndrome in children, MIS-C) in Switzerland. *Front Pediatr* [Internet] 26:9. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.667507>
- World Health Organization. (2020) Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19 scientific brief 15 May 2020 background [Internet]. 2020 [cited 2022 Sep 1]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>
- Vila Pérez D, Jordan I, Esteban E, García-Soler P, Murga V, Bonil V et al (2014) Prognostic factors in pediatric sepsis study, from the Spanish Society of Pediatric Intensive Care. *Pediatr Infect Dis J* 33(2):152–157. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000435502.36996.72>
- Solé-Ribalta A, Bobillo-Pérez S, Valls A, Girona-Alarcón M, Launes C, Cambra FJ et al (2020) Diagnostic and prognostic value of procalcitonin and mid-regional pro-adrenomedullin in septic paediatric patients. *Eur J Pediatr* [Internet] 179(7):1089–1096. <https://doi.org/10.1007/s00431-020-03587-7>
- Solé-Ribalta A, Launes C, Felipe-Villalobos A, Balaguer M, Luaces C, Garrido R et al (2022) New multivariable prediction model PEdiatric SEpsis recognition and stratification (PESERS score) shows excellent discriminatory capacity. *Acta Paediatr* [Internet]. [cited 2023 Jan 18];111(6):1209–19. <https://doi.org/10.1111/apa.16321>
- Kursa MB, Rudnicki WR (2010) Feature selection with the Boruta package. *J Stat Softw* [Internet]. 2010 [cited 2022 Oct 12];36(11). <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i11>
- Collins GS, Reitsma JB, Altman DG, Moons K (2015) Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement. *BMC Med* [Internet] 13(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0241-z>
- Pekhimenko GG. Penalized logistic regression for classification [Internet]. Toronto, ON M5S3L1; 2006 [cited 2023 Jan 18]. Available from: <https://www.cs.cmu.edu/~gpekhime/Projects/CSC2515/project.pdf>
- Kostik MM, Bregel LV, Avrusin IS, Dondurei EA, Matyunova AE, Efremova OS et al (2021) Distinguishing between multisystem inflammatory syndrome, associated with COVID-19 in children and the Kawasaki disease: development of preliminary criteria based on the data of the retrospective multicenter cohort study. *Front Pediatr* [Internet] 10:9. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.787353>
- Lin TA, Leo HL (2021) Characteristics and outcomes of US children and adolescents with multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) compared with severe acute COVID-19. *Pediatrics* [Internet] 148(Supplement 3):S75–S76. <https://doi.org/10.1542/peds.2021-053843FFFFF>
- Schlapbach LJ (2019) Paediatric sepsis. *Curr Opin Infect Dis* [Internet] 32(5):497–504. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000583>
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR et al (2020) Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* [Internet] 395(10219):200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
- More K, Aiyer S, Goti A, Parikh M, Sheikh S, Patel G et al (2022) Multisystem inflammatory syndrome in neonates (MIS-N) associated with SARS-CoV2 infection: a case series. *Eur J Pediatr* [Internet] 181(5):1883–1898. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04377-z>
- Santos MO, Gonçalves LC, Silva PAN, Moreira ALE, Ito CRM, Peixoto FAO et al (2022) Multisystem inflammatory syndrome (MIS-C): a systematic review and meta-analysis of clinical characteristics,

- treatment, and outcomes. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2022 Jul 1;98(4):338–49. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2021.08.006>
28. The Royal College of Paediatrics and Child Health (2020) Guidance: paediatric multisystem inflammatory syndrome temporally associated with COVID-19 [Internet]. 2020 May [cited 2022 Sep 1]. Available from: <https://www.rcpch.ac.uk/resources/paediatric-multisystem-inflammatory-syndrome-temporally-associated-covid-19-pims-guidance>
 29. Zhao Y, Yin L, Patel J, Tang L, Huang Y (2021) The inflammatory markers of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and adolescents associated with COVID-19: a meta-analysis. *J Med Virol* [Internet] 93(7):4358–4369. <https://doi.org/10.1002/jmv.26951>
 30. Rodriguez-Smith JJ, Verweyen EL, Clay GM, Esteban YM, de Loizaga SR, Baker EJ et al (2021) Inflammatory biomarkers in COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children, Kawasaki disease, and macrophage activation syndrome: a cohort study. *Lancet Rheumatol* [Internet] 3(8):e574–e584. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00139-9)
 31. Diaz F, Bustos BR, Yagnam F, Karsies TJ, Vásquez-Hoyos P, Jaramillo-Bustamante JC et al (2021) Comparison of interleukin-6 plasma concentration in multisystem inflammatory syndrome in children associated with SARS-CoV-2 and pediatric sepsis. *Front Pediatr* [Internet] 15:9. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.756083>
 32. Solé-Ribalta A, Bobillo-Pérez S, Jordan-García I (2022) A review of adrenomedullin in pediatric patients: a useful biomarker. *Children* [Internet] 9(8):1181. <https://doi.org/10.3390/children9081181>
 33. Tibi R, Hadash A, Khoury A, Butbul-Avieli Y, Ben-Ari J, Shavit I (2022) Emergency department levels of NT-proBNP and inotropic/vasoactive support in multi-inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Am J Emerg Med* [Internet] 1(56):296–297. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2021.07.046>
 34. Zhao Y, Patel J, Huang Y, Yin L, Tang L (2021) Cardiac markers of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) in COVID-19 patients: a meta-analysis. *Am J Emerg Med* [Internet] 1(49):62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2021.05.044>
 35. Toczyłowski K, Łasecka-Zadrozna J, Pałyga-Bysiecka I, Ludwikowska KM, Okarska-Napierała M, Dudek N et al (2022) Use of broad-spectrum antibiotics in children diagnosed with multisystem inflammatory syndrome temporarily associated with SARS-CoV-2 infection in Poland: the MOIS-CoR study. *Int J Infect Dis* [Internet] 122:703–709. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.021>
 36. Yock-Corrales A, Lenzi J, Ulloa-Gutiérrez R, Gómez-Vargas J, Antúnez-Montes OY, Rios Aida JA et al (2021) High rates of antibiotic prescriptions in children with COVID-19 or multisystem inflammatory syndrome: a multinational experience in 990 cases from Latin America. *Acta Paediatr* [Internet] 110(6):1902–1910. <https://doi.org/10.1111/apa.15847>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

María Hernández-García^{1,2} · Elies Roldan-Berengue³ · Carmina Guitart^{2,4} · Mònica Girona-Alarcón^{2,4} · Guillermo Argüello^{5,6} · Rosa Pino¹ · Mariona F. de Sevilla^{1,2,7,8} · Juan José García-García^{1,2,7,8} · Iolanda Jordan^{2,4,7,8}

✉ Iolanda Jordan
iolanda.jordan@ub.edu; yolanda.jordan@sjd.es

María Hernández-García
maria.hernandezg@sjd.es

Elies Roldan-Berengue
mdroldanelias@uic.es

Carmina Guitart
carmina.guitart@sjd.es

Mònica Girona-Alarcón
monica.girona@sjd.es

Guillermo Argüello
garguello@uoc.edu

Rosa Pino
rosamaria.pino@sjd.es

Mariona F. de Sevilla
mariona.fernandez@sjd.es

Juan José García-García
juanjose.garciag@sjd.es

¹ Paediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu
Barcelona, Barcelona, Spain

² Infectious Diseases and Microbiome, Institut de Recerca Sant
Joan de Déu (IRSJD), Barcelona, Spain

³ Department of Medicine, Universitat Internacional de
Catalunya, Barcelona, Spain

⁴ Paediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu
Barcelona, Barcelona, Spain

⁵ Faculty of Computer Science, Multimedia
and Telecommunications, Universitat Oberta de Catalunya,
Barcelona, Spain

⁶ Statistics and Operations Research, Universidad de Oviedo,
Oviedo, Asturias, Spain

⁷ Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de
Barcelona, Barcelona, Spain

⁸ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología
y Salud Pública (CIBER-ESP), Instituto de Salud Carlos III,
Madrid, Spain

4.4. Cuarto estudio

El cuarto estudio responde a los siguientes objetivos:

2. Analizar la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos dentro de cohortes controladas.
- 2.1. Estudiar la transmisión durante la realización de actividades deportivas.

Hernández-García M, Bassat Q, Fumado V, Rodas G, Pi R, Miranda-García M, Girona-Alarcón M, Català M, Alonso S, Álvarez-Lacalle E, López D, Melé-Casas M, Pons-Tomás G, F de Sevilla M, Bonet-Carne E, Fortuny C, García-Miquel A, Jou C, Adroher C, Claverol J, Cubells M, Codina A, Cuadras D, Gratacós E, Brotons P, Muñoz-Almagro C, Prats C, García-García JJ, Jordan I. SARS-CoV-2 transmission in teenagers and young adults in Fútbol Club Barcelona's Multidisciplinary Sports Training Academy. *European Journal of Pediatrics*. 2023 May;182(5):2421-2432. doi: 10.1007/s00431-023-04880-x. Epub 2023 Mar 14. PMID: 36914778; PMCID: PMC10010953.

Resumen:

Introducción: La mayoría de los estudios destinados a determinar la incidencia y la transmisión del SARS-CoV-2 en la población pediátrica han sido desarrollados en el ámbito escolar.

Objetivo: Evaluar la transmisión del SARS-CoV-2 entre los adolescentes y adultos jóvenes que participaban en las actividades deportivas dentro de las instalaciones del Fútbol Club Barcelona (FCB), para encontrar factores relacionados con la transmisión.

Material y métodos: Estudio prospectivo y observacional desarrollado en las instalaciones deportivas del FCB, en Barcelona, España, durante toda la temporada 2020-2021. Los participantes fueron jugadores jóvenes (de cinco deportes diferentes) y trabajadores adultos, que pertenecían a equipos estables (compartían rutinas y estaban involucrados en las mismas reglas de cuarentena). Para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica se realizaron cuestionarios de salud y pruebas de detección de SARS-CoV-2 cada 1-2 semanas.

Resultados: El estudio incluyó a 234 participantes, 70 (30%) vivían y entrenaban en las instalaciones deportivas del FCB mientras que los otros 164 (70%) vivían en sus propios domicilios y solo iban a las instalaciones a entrenar. Durante el estudio se identificaron 38 casos positivos en total, ninguno tuvo síntomas graves ni requirió ingreso. La incidencia global de la infección no difirió de la esperada en la comunidad, excepto por un brote que ocurrió durante 2 semanas afectando a 24 participantes. Se demostró que la tasa de ataque fue 3 veces superior entre los participantes que vivían y entrenaban en las instalaciones deportivas, en comparación con aquellos que solo iban a entrenar. La tasa de ataque también fue mayor en un equipo de baloncesto, un deporte de interior.

Conclusiones: La realización de actividades deportivas en equipos estables y siguiendo medidas de prevención es segura, ya que se demostró la misma incidencia de casos respecto a lo esperado en la comunidad. El riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 es mayor en deportes de interior (mayor incidencia en baloncesto respecto a fútbol) y en lugares de mayor convivencia entre jugadores (mayor incidencia entre los participantes que vivían y entrenaban en las instalaciones deportivas respecto a aquellos que solo iban a entrenar).



SARS-CoV-2 transmission in teenagers and young adults in Fútbol Club Barcelona's Multidisciplinary Sports Training Academy

María Hernández-García¹ · Quique Bassat^{1,2,3,4,5} · Victoria Fumado^{3,6,7,8} · Gil Rodas^{9,10} · Ramon Pi¹⁰ · Maite Miranda-García^{7,11} · Mònica Girona-Alarcón^{7,12} · Martí Català¹³ · Sergio Alonso¹⁴ · Enrique Alvarez-Lacalle¹⁴ · Daniel López¹⁴ · Maria Melé-Casas¹ · Gemma Pons-Tomas¹ · Mariona F. de Sevilla^{1,3,7,8} · Elisenda Bonet-Carne^{7,15,16,17} · Claudia Fortuny^{3,6,7,8} · Aleix García-Miquel^{11,15} · Cristina Jou^{7,18,19} · Cristina Adroher²⁰ · Joana Claverol^{7,11} · Marta Cubells^{7,11} · Anna Codina^{7,18} · Daniel Cuadras²¹ · Eduard Gratacós^{7,15,16,19} · Pedro Brotons^{3,7,22} · Carmen Muñoz-Almagro^{3,22,23} · Clara Prats¹⁴ · Juan José García-García^{1,3,7,8} · Iolanda Jordan^{3,7,8,12}

Received: 7 December 2022 / Revised: 13 February 2023 / Accepted: 14 February 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Most studies, aimed at determining the incidence and transmission of SARS-CoV-2 in children and teenagers, have been developed in school settings. Our study conducted surveillance and inferred attack rates focusing on the practice of sports. Prospective and observational study of those attending the sports facilities of Fútbol Club Barcelona (FCB), in Barcelona, Spain, throughout the 2020–2021 season. Participants were young players (from five different sports) and adult workers, who belonged to stable teams (shared routines and were involved in same quarantine rules). Biweekly health questionnaires and SARS-CoV-2 screening were conducted. From the 234 participants included, 70 (30%) both lived and trained in the FCB facilities (Recruitment Pathway 1;RP1) and 164 (70%) lived at their own household and just came to the facilities to train (RP2). During the study, 38 positive cases were identified; none had severe symptoms or needed hospitalization. The overall weekly incidence in the cohorts did not differ compared to the one expected in the community, except for 2 weeks when an outbreak occurred. The attack rate (AR) was three times higher for the participants from RP1, in comparison to those from RP2 ($p < 0.01$). A Basketball team showed a significant higher AR.

Conclusion: Physical activities in stable teams are not related to an increased risk of transmission of SARS-CoV-2, since there were the same observed cases than expected in the community. The risk is higher in indoor sports (Basketball vs. Football), and in closed cohort living settings (RP1 vs. RP2). The fulfilment of preventive measures is essential.

What is Known:

- Despite the low numerical impact caused in paediatric hospitalizations during COVID-19 pandemic, the social impact has been maximum.
- The transmission potential in children and teenagers is limited, and it had been widely demonstrated in school settings.

What is New:

- Group physical activities in children and teenagers are not also related to an increased risk of transmission of SARS-CoV-2, when preventive measures, such as washing hands, and screening protocols are applied.
- Routine and semi-professional sports activities seem safe environments to promote during this pandemic.

Keywords COVID-19 · SARS-CoV-2 · Adolescent · Transmission · Sports · Youth sports

Communicated by Peter de Winter

Juan José García-García and Iolanda Jordan contributed equally and should share senior authorship.

✉ Juan José García-García
juanjo_garcia@ub.edu; juanjose.garciag@sjd.es

Extended author information available on the last page of the article

Abbreviations

AR	Attack rate
COVID-19	Coronavirus disease 2019
FCB	Fútbol Club Barcelona
NP Ag	Nasopharyngeal antigen
NP PCR	Nasopharyngeal polymerase chain reaction

RP	Recruitment pathway
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

Introduction

The literature generally describes a lower incidence, transmission and severity of SARS-CoV-2 in the paediatric population [1–3]. The emergence and spread of new variants, such as B.1.1.529 (Omicron), threaten the findings observed during the first 2 years of the pandemic [4], and the real repercussion on children and teenagers remains to be seen.

Despite the low impact caused in paediatric hospitalizations, the social impact has been maximum [5]. Based on data from other viral infections, it was hypothesized that children should be one of the main targets of confinement at the start of the pandemic [6–8]. Current data indicates the contrary, and there is ample evidence, for example, in the context of reopening of schools, that children's transmission potential is limited [9, 10], also appearing to increase with age [11].

Most studies have been conducted in schools and in ages below 12–15 years [12, 13], with little investigation in sports [14, 15], an area in which it should be done more emphasis given its important contribution for overall health, mental health and school performance. During successive waves, most countries chose to limit sports activities, without good-quality data supporting such decisions, leading to deleterious effects on the youngsters, limiting their learning and their ability to maintain a level of recommended physical activity [16].

One proposed solution for transmission containment is proactive screening before participation in sports. This is particularly common at the competition level [17]. Before vaccines were available, one approach involved IgG antibodies testing, with a positive serology implying protection, a method abandoned with widespread vaccination. Furthermore, the evolution of the infection, the longevity of the immune response [18] and the correlation of antibody levels with clinical protection remain insufficiently characterized to date [19]. The main useful diagnostic method has been nasopharyngeal PCR, followed by nasopharyngeal antigen and saliva PCR. The problem is that the sensitivity and specificity of the tests available on a large scale remain variable [20], which makes it difficult to establish standardized screening protocols in the sports field.

Conducting a study within the facilities of Fútbol Club Barcelona (FCB), where many teenagers and young people live or meet routinely, provided an unprecedented opportunity to determine transmission of SARS-CoV-2 in the world of semi-professional sports. FCB hosts outdoors and indoors

sports, with different contact between players, which could lead to distinct transmission patterns. Furthermore, the fact that participants shared both sports activities and living spaces offered a good setting to study what can happen with the maintenance of sports activities in other areas.

The aim of the study was to carry out SARS-CoV-2 surveillance and infer attack rates among adolescents in the FCB facilities, trying to find factors related to transmission.

Materials and methods

Prospective, observational and longitudinal study of those attending FCB sports facilities, in Barcelona, Spain, throughout the 2020–2021 season (August 1st 2020–June 16th 2021).

Included participants were teen players (12–17 years old), young adult players (18–23 years old) and adult workers. Participants who did not sign the informed consent or unwilling to ensure adequate follow-up were excluded.

Study development

Two recruitment pathways (RP) were considered: RP1 included participants who lived, studied and trained in the facilities (a residential and sports area called “Masia”); RP2 included participants who lived in their own homes, and just went to train and study in the facilities. Seven complete teams were tracked during the whole course: Outdoor Football, Men: (1) Senior youth A, (2) Senior youth B, (3) Junior youth A; Outdoor Football, Women: (4) Reserve, (5) Senior youth; Basketball: (6) Reserve, (7) Senior youth. In each of them, there were participants who belonged to RP1 and RP2. In addition to these seven teams, others were studied, although not all their components wanted to participate.

A survey was conducted upon recruitment including clinical and epidemiological data. During follow-up, a biweekly health questionnaire was applied enquiring about symptoms and possible COVID-19 contacts. A nasopharyngeal (NP) PCR was performed every 15 days, together with a weekly saliva sample (stored as backup sample). Serologies were done upon enrollment and every 3 months.

From January to June 2021, nasopharyngeal antigens (NP Ag) replaced PCRs, a change applied in parallel to its wider implementation, facilitating a faster turnaround of results. Considering the possibility of false negatives, testing frequency was increased to a weekly basis. However, if participants reported symptoms, or were a contact of a positive case, an additional NP PCR was performed.

When a positive case was detected in a team (considered stable sport-specific groups, made up of the same participants throughout the course, following the same routines and isolation protocols), all its components were considered close contacts, so they were studied and immediately confined (see more information in the Supplementary file).

According to Spanish legislation, the use of face masks was compulsory, and it was recommended to maintain a minimum interpersonal distance and to wash hands regularly. However, players within the same team were allowed to remove masks during training or in their houses/rooms. Other preventive measures were applied, such as daily temperature control (see more information in the Supplementary file).

The first vaccination campaign against SARS-CoV-2 in Spain began on December 27th 2020. The campaign for the population between 16 and 29 years old started on June 30th 2021. During the study, 23 (36%) adult workers received at least one vaccine.

Definitions

A positive case was defined as a participant with a positive NP PCR/Ag, in the absence of IgG. At enrollment, cases with positive PCR but also positive IgG were considered past infections and were not included as positive cases. The only evidence of a following seroconversion in the vaccinated participants was not criteria for the definition of a positive case.

Cases with an indeterminate PCR were closely followed up by questionnaires and weekly PCR, and were considered negative unless a subsequent PCR resulted positive.

We could not distinguish between primary and secondary positive cases, due to the participants belonged to “crossed” cohorts: those belonging to RP1 or RP2 vs. each particular team independently of where they live.

Outcomes

The primary outcome was to determine the attack rate (AR) in the different cohorts: RP1, RP2, and the seven complete teams. For each cohort, we defined the AR as the percentage of participants who provided at least one positive test during the study. We chose this method instead of widely used ones such as the secondary attack rate (SAR) due to the impossibility of explicitly defining the primary and secondary cases, given the stated crossed-nature of the cohorts.

$$AR = \frac{\text{Number of positive cases in side the cohort}}{\text{Number of participants of the cohort}} \cdot 100$$

With the aim of identifying when transmission was significant and led to local outbreaks, we determined the expected number of cases that would be found according to the surrounding incidence (see more information in the Supplementary file).

Laboratory measurements

SARS-CoV-2 PCR in NP and saliva was performed according previous published[21]. A positive result was considered if at least two SARS-CoV-2 genes were detected, considering “indeterminate” when only one gene was detected.

Rapid Antigen Test used was from Roche®. IgG, IgA and IgM antibodies were determined using a Luminex system against the receptor-binding domain of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2.

Ethics

The study was approved by the Institutional Review Board and the Sant Joan de Déu Ethics Committee (PIC-200–20) and followed Helsinki Declaration recommendations. All participants or their legal guardians provided a written informed consent.

Statistics

A Redcap-designed database was used and participant’s data were pseudo-anonymized. All athletes, except the professional teams, were offered participation, so no formal sample size calculation was conducted.

Chi-squared test and Fisher’s exact test were used for comparisons of categorical data; Student’s *t*-test and Mann–Whitney’s *U*-test for quantitative variables. To compare epidemiological and microbiological results at different times, the Wilcoxon signed-rank test was used. Odds ratio, determined with Fisher’s exact test and a 2×2 table (Matlab’s function), was used to assess the AR of a specific cohort in relation to all the others.

Results

Of 283 eligible athletes and workers, 246 were initially recruited, of whom 234 were finally included (83% of participation). Eight participants were lost in the follow-up. From the 234 individuals, 170 were players (125 teen and 45 young adult; overall mean age of 16.4 years, SD=2.14) and 64 adult workers (mean age 39.4 years, range 27–61, SD=8.53). Seventy participants (30%) came from RP1 (lived in the Masia) and 164 (70%) from RP2 (lived in their

own household). Participants played in five different sports: football (outdoor and indoor), basketball, handball and hockey. Overall, 141 (82.5%) players were males. Football had both men's and women's team; the rest of sports had only men's team. Table 1 details the participants' characteristics; Table 2 details sports and teams.

A total of 1986 NP PCR and 2777 NP Ag were obtained. Additionally, serological testing was conducted to 229, 118, 214 and 192 of participants, during the different scheduled time points. Eighty-two participants (35%) reported symptoms at least once in the health questionnaires.

Positive cases

Altogether, 38 positive cases were identified: 34 players and 4 workers. Twenty-one came from the RP1 and 17 from the

RP2. Fifteen out of 34 players (44%) had mild symptoms (fever and cough the most frequent), being the remaining 56% asymptomatic. However, most workers (75%) were symptomatic. None of the positive cases had severe symptoms or required hospitalization. All data on positive cases are described in Tables 1 and 2.

In October 2020 (43rd–44th week of the year), there was an unexpected outbreak. Twenty-four positive cases were detected, most of them (75%) from RP1. Five initially positive cases were identified, as they presented symptoms or had positive tests first. Four of them lived in the Masia, although belonged to three different teams. Most of the positive cases belonged to basketball teams. All data is showed in Fig. 1.

The remaining 14 positive cases were either isolated or with transmission to a single person within the same team.

Table 1 Epidemiological general characteristics of the participants, positive cases and non-infected participants comparison

Variable	All participants (<i>n</i> = 234)	Positive cases (<i>n</i> = 38)	Non-infected participants (<i>n</i> = 196)	<i>p</i>
Gender, male	185 (79%)	34 (89%)	151 (77%)	0.125
Age, years	20.2 (12–61)	18.4 (12–50)	20.6 (12–61)	0.174
Ethnicity				0.008
Caucasian	174 (74.4%)	22 (57.9%)	152 (77.5%)	
Indian-Asian	2 (0.9%)	1 (2.6%)	1 (0.51%)	
Maghrebi-Arabians	3 (1.3%)	0	3 (1.53%)	
Latin-Americans	13 (5.6%)	2 (5.3%)	11 (5.6%)	
Sub-Saharan	4 (1.7%)	3 (7.9%)	1 (0.5%)	
Others	38 (16.2%)	10 (26.3%)	28 (14.3%)	
Previous disease	15 (6.4%)	2 (5.3%)	13 (6.6%)	0.75
Hospitalization during 2020	13 (5.6%)	2 (5.3%)	11 (5.6%)	0.93
Infections in previous 3 months				
Respiratory	2 (0.8%)	0	2 (1%)	0.53
Gastroenteritis	6 (2.6%)	0	6 (3%)	0.27
Other	5 (2.1%)	0	5 (2.5%)	0.31
Household inhabitants	3 (0–7)	4 (0–7)	3 (0–7)	0.21
House surface (m ²)	131	171	123	0.37
Number of bathrooms in house	2 (1–6)	2 (1–4)	2 (1–6)	0.85
Sharing bedroom	84 (35.9%)	9 (23.7%)	75 (38.3%)	0.08
Adults > 65 years in household	1 (2.1%)	0	1 (2.4%)	0.72
Wearing masks in the street	215 (91.9%)	35 (92.1%)	180 (91.8%)	0.38
Transport used to reach campus				0.08
Walking/cycling	26 (11.1%)	2 (5.3%)	24 (12.2%)	
Public transport	33 (14.1%)	4 (10.5%)	29 (14.8%)	
Private transport	119 (50.8%)	17 (44.7%)	102 (52%)	
Does not apply (lives there)	56 (23.9%)	15 (39.5%)	41 (20.9%)	
Other suspected or confirmed COVID cases in household				
Adult	15 (6.4%)	0	15 (7.7%)	0.07
Children	7 (3%)	0	7 (3.6%)	0.23

Table 2 Classification of the teams to which both players and adults belonged, including the description of the positive cases and the attack rate (AR) of each monitored team in the study

Sport	Teams			Total participants	Positive cases (% respect of all positive cases)	Attack rate (AR)
7 complete monitored teams						
Outdoor Football	Men	Senior youth A	Players	26	5 (13%)	14%
			Workers	9	0	
		Senior youth B	Players	24	8 (21%)	24%
			Workers	9	0	
		Junior youth A	Players	22	2 (5%)	8%
	Workers		4	0		
	Women	Reserve	Players	18	2 (5%)	10%
			Workers	3	0	
		Senior youth	Players	13	1 (3%)	8%
			Workers	0	0	
Basketball			Reserve	Players	12	1 (3%)
	Workers	3		1 (3%)		
	Senior youth	Players	12	8 (21%)	67%	
		Workers	3	2 (5%)		
Total complete monitored teams				158	30 (79%)	19%
Rest of the participant but incomplete teams						
Outdoor Football	Men	Junior youth B	Players	4	3 (8%)	NA
			Workers	0	0	
		Junior youth C	Players	6	0	NA
			Workers	0	0	
		Junior youth D	Players	3	0	NA
			Workers	0	0	
Indoor Football		Reserve		5	1 (3%)	NA
		Senior youth		1	0	NA
		Junior youth		1	0	NA
		Workers		0	0	NA
Basketball	Junior youth A	Players	4	1 (3%)	NA	
		Workers	0	0		
	Junior youth B	Players	1	1 (3%)	NA	
		Workers	0	0		
Handball		Reserve		3	0	NA
		Senior youth		2	1 (3%)	NA
		Junior youth A		3	0	NA
		Junior youth B		1	0	NA
		Workers		0	0	NA
Hockey		Reserve		4	0	NA
		Senior youth		4	0	NA
		Junior youth		1	0	NA
		Workers		0	0	NA
Other workers				33	1 (3%)	NA
Total incomplete teams				76	8 (21%)	NA

Note that the attack rate of the incomplete teams are not reported (NA, non-applicable), since the information of the whole team for the whole period was not available

Age ranges (in years old): Reserve team 18–23, Senior youth team 16–18, Junior youth team 14–16 (applicable to A and B teams) and 12–13 (applicable to C and D teams)

Attack rates, expected incidence and infectivity

The mean of contacts studied from the same team for each positive case was 11 (IQR 14). The global AR of the participants from RP1 was 30%, being 10% of those from RP2. Among the seven monitored teams, the overall AR was 19%, being 35% the AR of the participants from RP1, and 13% the AR of those from RP2. The ARs of each monitored team are reported in Table 2.

The pairwise comparisons showed significant differences between the AR regarding the recruiting pathway, with an odds ratio (OR) of 3.7 [1.8–7.6], entailing that the AR was higher among participants from RP1 when compared with RP2. If we compare the AR of RP1 participants that lived in the Masia with regard to those that worked there, the difference was even higher ($p < 0.01$, OR 13.7 [1.8–107.1]). Furthermore, focusing on the seven monitored teams, we compared the AR among those that lived in the Masia with those that did not, obtaining a significant OR of 3.6 [1.6–8.2].

As for the monitored teams, the only one that showed a significant increase in its AR was the Basketball Senior youth, with an OR of 12.3 [3.8–39.7]. This significance was lost when the comparison was restricted to those from RP1, while it was maintained when comparing to those from RP2 (see more information in the Supplementary file).

The number of tests performed and the observed positive cases according to the detection probability in comparison to the surrounding areas are presented in Fig. 2. The figure shows that major outbreaks were rare, except for the one already mentioned. The total number of expected cases throughout the study was 16.2 [95%CI 10–23], being 38 the observed cases, therefore more than expected. However, recalculating without taking the outbreak into account, the expected cases were 13.6 [95%CI 8–20], and the observed cases were 14, which entails a non-significant difference.

Regarding infectivity, the PCRs performed remained positive for a median of 1.5 weeks (range 1–4). Having a persistently positive PCR more than 10 days was not associated with having symptoms, and neither to an increased infectivity to others.

Fig. 1 October 2020 positive cases outbreak (21st to 30th October). The cases are differentiated in three rounds according to the dates of the first positive test (PCR or Ag) or the first symptom, in order to show the temporal evolution (blue, cases dated between 21st and 22nd October; red, cases dated between 23rd and 24th October; black, cases dated between 26 and 30th October). They are included in their Sport and Category “Bubble” (teams, green circles) as well as in their household “bubble” (in or out the Masia, in the Masia being included in the red circle). The grey numbers indicate the size of the tracked cohorts. Absence of grey number indicates that such team was not included as a whole in the study (i.e. the participant was followed through the Masia)

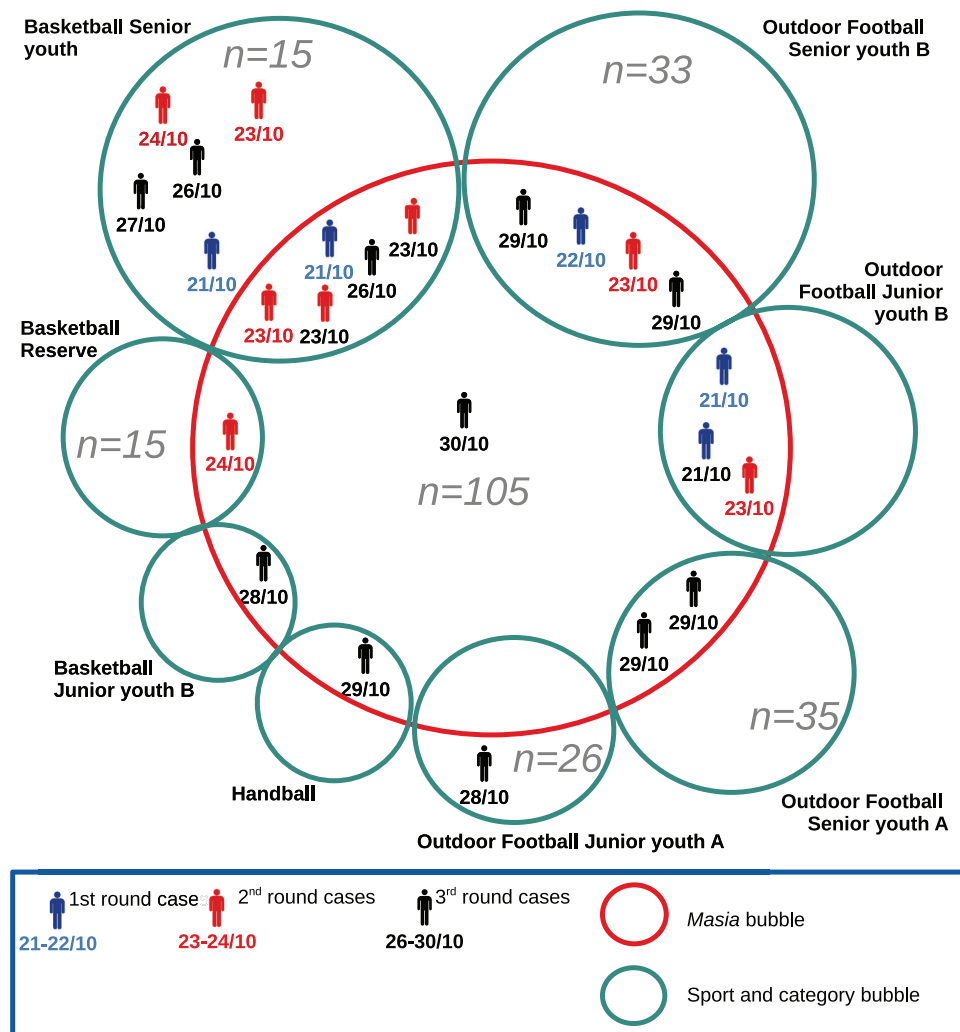
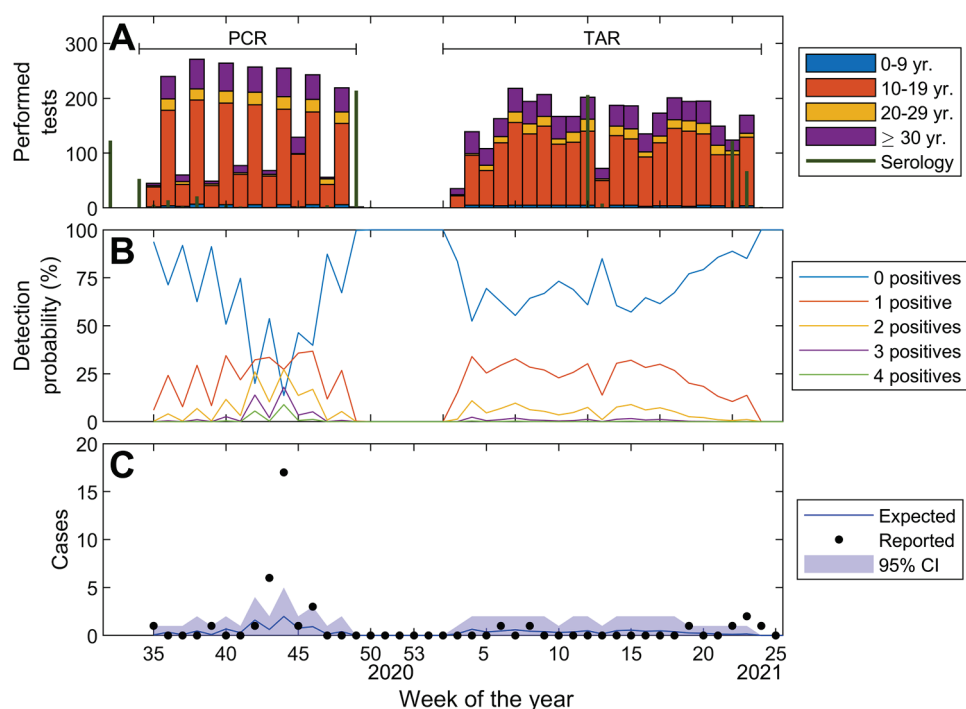


Fig. 2 Expected and detected positive cases, and number of performed tests. **A** Number of PCR, Ag test and serologies performed during the study, per week and divided into age ranges. **B** Probability of detecting 0 to 4 positives each week, based on the tests performed. **C** Number of positive cases reported compared to those expected (taking as a reference the incidence of positive cases at the same moment in the surrounding areas of the FCB facilities), with 95% CI (for the expected cases)



Seroconversion

Results from the baseline screening conducted to 225 individuals included no positive PCRs and 11 positive IgG, which were subsequently considered past infections. Only one of these 11 became re-infected, while maintaining the serologic positivity at the end of the study. From the other 10, only one lost the seroconversion.

Along the study, 35 from the 214 (16.3%) with initially negative baseline PCR and serology became infected; most of them (91.4%) presented seroconversion.

From the 179 participants for whom a positive SARS-CoV-2 result was never documented, 36 (20.1%) had seroconverted by the end of the study. Of them, 20 (55%) were vaccinated against SARS-CoV-2, so the positive IgG were explained by immunization. Of the other 16 participants: eight (22.5%) had a positive test, although it was done outside the study (e.g. primary care center); and the remaining eight (22.5%) had no data of a positive test, so those were the only ones considered infected although being asymptomatic and with negative tests. All these data are showed in Fig. 3.

Discussion

During the first waves of the pandemic, several countries imposed strict restrictions on children, including closing of schools and limiting the practice of sports, since at that time they had been considered super-spreaders of SARS-CoV-2. However, there was not robust evidence supporting these restrictions, leading to discussion regarding the safe return

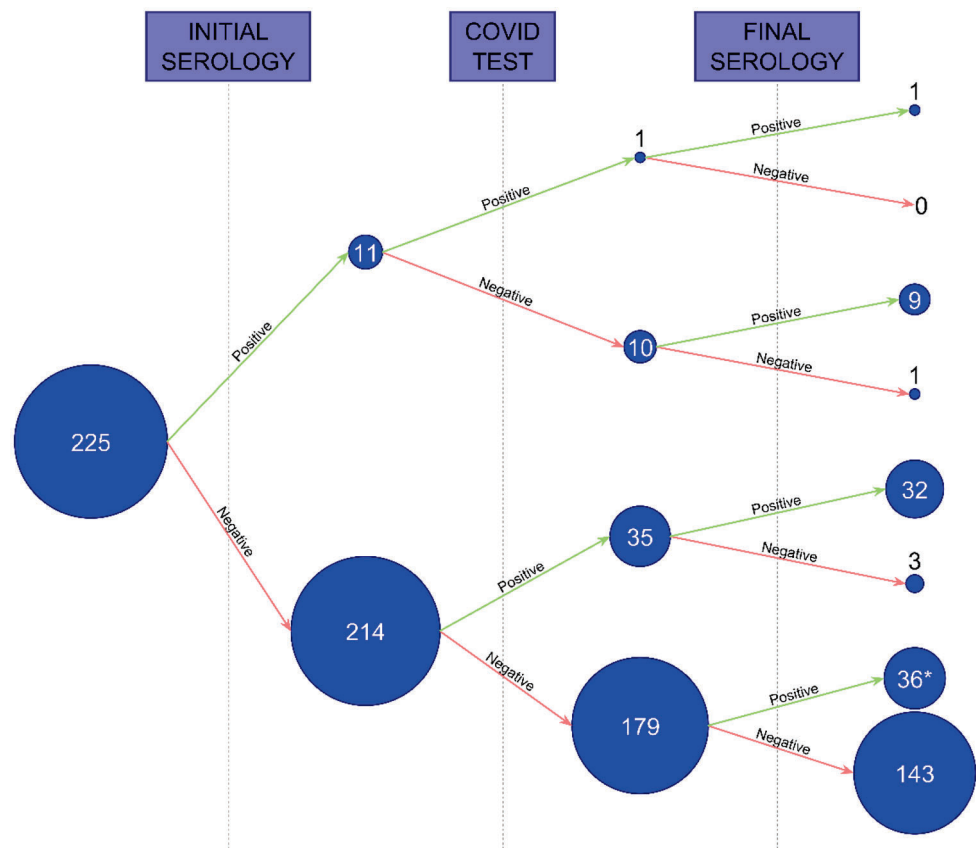
to normal activities in schools and teams for the 2020–2021 season [22, 23].

Endorsing limitations in sports has had serious consequences on both mental and physical health [24]. Anxiety, depressive symptoms and increased suicidal ideation have been reported [5, 25]. Furthermore, a greater sedentary lifestyle has been described, which could lead to serious long-term outcomes, such as metabolic syndrome, obesity and diabetes [16].

One of the basis for these restrictions was that some evidence suggested an increased risk of transmission due to a higher excretion of microparticles during sports [26]. While this might be true in adults, it has not been demonstrated in younger people. In fact, our study shows that physical activities in stable teams are not related to an increased risk of transmission, since only one outbreak occurred, and the rest of the season there were the same observed cases than expected cases in the community. Actually, there was no statistically significant difference between both incidences when subtracting the outbreak, i.e. most part of the time the number of detected cases was within the expected interval.

To ensure less transmission, the fulfilment of preventive measures such as hand washing and wearing masks is essential [27]. Using face masks has been associated with a lower incidence among indoor sports, and may be protective among outdoor sports with prolonged close contact between players [28]. Other implemented measures are regular symptoms monitoring and temperature measurement [17]. These strategies seem insufficient in young people, who mainly remain asymptomatic or with mild symptoms [1]. Therefore,

Fig. 3 Description of the seroconversion throughout the study. Of the 234 participants, 225 were the ones who underwent both initial and final serology during the whole study. From the 179 participants, with an initial negative serology, for whom a positive SARS-CoV-2 result was never documented, 36 (20.1%) had seroconverted by the end of the study. *Of these 36 participants, 20 (55%) were vaccinated against SARS-CoV-2 during the study, so the positive IgG are explained by the immunization. From the other 16 participants: 8 (22.5%) of them did have a positive test, although it was done outside the study (through the primary care center or privately), and the remaining 8 (22.5%) had no data of a positive test either inside or outside the study



regular testing is crucial. Usually among professional athletes, a negative test is needed to be able to play, but this condition is not required in the younger ones; so, our study was a good opportunity since it offered real-time results.

Previous studies, regarding the impact of the implementation of preventive protocols in sports, have demonstrated a reduction in the observed cases with respect to the expected [29]. Our study does not show fewer observed cases than expected, but the same. This suggests that despite its complexity in terms of transmission, protocols can be implemented in the sports centers to reduce the average in terms of infections. In this way, if they were improved, they would lead to safer environments.

Another important point observed is the different attack rate in the cohorts, since it was three times higher in the participants living in the Masia than in participants who lived at their own households (30% vs. 10%). The same difference was observed in the seven monitored teams (higher AR in those who came from RP1). In addition, AR was significantly higher in those who lived in the Masia compared to those who only worked there. This is related to the great outbreak derived from common life in the Masia, where transmission was easier due to the close contact during cohabitation and the difficulty in guaranteeing the safety distance and the use of face masks at all times. As is well known, a high level of indoor interactions can produce major outbreaks.

When analyzing the type of sport, lower transmission has been reported in outdoor and non-contact sports [28]. In our study, we saw a higher AR on a basketball team, an indoor and contact sport. However, no differences were found when analyzing the types of sport depending on the place of residence.

Going back to the outbreak, a possible explanation for it was that the initial case could have been infected outside the facilities (only one out of the five initially positive cases belonged to RP2); however, we did not have enough evidence to prove that this participant was the initial case. Other authors have found that the majority of cases in these settings are predominantly attributed to community contacts, rather than transmission during sports [30].

Finally, another consideration is the high level of detection inferred from seroconversion. The fact that only 22.5% of the seroconversions had not previously been detected is a particular low value. Underdetection seemed to be restricted to cases without symptoms or so mild that they were not reported. Antibody levels have been correlated with severity, with moderate and severe cases being the most likely to detect antibodies [31]. This points out to an almost complete detection of moderate cases and a large detection of mild cases with systematic weekly screening.

To conclude, it was relevant that nine patients maintained positive IgG along the study, without being vaccinated or re-infected. While some authors have described a serology duration of about 5 months [32], others have described a

longer seropositive response in teenagers and in patients with severe symptoms [33].

Limitations

We could not infer attack rates in all the teams, as we lacked information on the ones who did not want to participate and those who were lost in the follow-up. In addition, it is possible that the established interval between testing could have meant that not all asymptomatic positive cases were detected. On the other hand, the study population was heterogeneous (more men than women, different age groups, specific sports...), which could mean that the study could not be extrapolated to all sports settings. Finally, some participants were immunized against SARS-CoV-2, so serologies became no longer helpful to discern a past infection.

Given the variability of infectivity and severity associated with each of the SARS-CoV-2 variants, it is possible that if this study had been carried out in season 2021–2022, in which the Omicron variable predominates and the majority of population including children were vaccinated, the outcomes would have been different.

Conclusions

Physical activities in stable teams, especially outdoors, are not associated with an increased risk of transmission of SARS-CoV-2, since there were the same observed cases than expected in the community. A high level of interactions in closed settings can increase the risk of transmission and lead to major outbreaks. To reduce this risk, compliance with preventive measures is essential.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00431-023-04880-x>.

Acknowledgements To all the workers from Fútbol Club Barcelona (FCB), especially to Anna Regatero, Paola Perezoso, Emilio Avendaño and Manel García. We are also indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

Authors’ Contributions All authors contributed to the study conception and design. Acquisition, analysis or interpretation of data was performed by María Hernández-García, Gil Rodas, Ramon Pi, Maite Miranda-García, Martí Català, Sergio Alonso, Enrique Alvarez-Lacalle, Maria Melé-Casas, Gemma Pons-Tomas, Anna Codina, Carmen Muñoz-Almagro, Daniel Cuadras and Clara Prats. The first draft of the manuscript was written by María Hernández-García, Quique Bassat, Victoria Fumado, Enrique Alvarez-Lacalle, Clara Prats, Juan José García-García and Iolanda Jordan; and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This study was supported by the Kids Corona platform (funding from Banco Santander, Stavros Niarkos

Foundation and other private donors), which contributed to the collection and analysis of data.

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval The study was approved by the Institutional Review Board and the Sant Joan de Déu Ethics Committee (PIC-200–20) and was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki.

Consent to participate All participants or their legal guardians (of those participants under 16 years old) provided a written informed consent.

Conflict of interest Authors Enrique Alvarez-Lacalle, Daniel López and Clara Prats declare: Grants or contracts: SARS-CoV-2 and other respiratory viruses in childhood: different focuses to define predictive models for its diagnosis and epidemiological evolution. Funds paid to the university. Fundació La Marató. CNECT/LUX/2020/LVP/0085, LC-01591965. PI: Clara Prats. Funds paid to the university. European Commission, DG-CONNECT. Authors Daniel López and Clara Prats declare as well: Grants or contracts: Competitive research project funded by the Spanish government (PGC2018-095456-B-I00). PI: Clara Prats. Funds paid to the university. Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España. Monitoring of COVID-19 epidemic in Catalonia (Spain). PI: Clara Prats. Funds paid to the university. Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS). Authors Enrique Alvarez-Lacalle and Clara Prats declare as well: Consulting fees: JANSSEN CILAG SA, for the monitoring and prediction of COVID-19 incidence in Spanish regions in the context of the Phase III clinical trial of their vaccine. Funds paid to the university. None of the previous statements has been directly or indirectly related to the work submitted for publication. The rest of the authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Castagnoli R, Votto M, Licari A, Brambilla I, Bruno R, Perlini S, Rovida F, Baldanti F, Marseglia GL (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection in children and adolescents: a systematic review. *JAMA Pediatr* 174(9):882–889. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.1467>
2. Gaythorpe KAM, Bhatia S, Mangal T, Unwin HJT, Imai N, Cuomo-Dannenburg G, Walters CE, Jauneikaite E, Bayley H, Kont MD, Mousa A, Whittles LK, Riley S, Ferguson NM

- (2021) Children's role in the COVID-19 pandemic: a systematic review of early surveillance data on susceptibility, severity, and transmissibility. *Sci Rep* 11(1):13903. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92500-9>
3. Choi S-H, Kim HW, Kang J-M, Kim DH, Young CE (2020) Epidemiology and clinical features of coronavirus disease 2019 in children. *Clin Exp Pediatr* 63(4):125–132. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00535>
 4. Khan A, Khan T, Ali S, Aftab S, Wang Y, Qiankun W, Khan M, Suleman M, Ali S, Heng W, Ali SS, Wei DQ, Mohammad A (2021) SARS-CoV-2 new variants: characteristic features and impact on the efficacy of different vaccines. *Biomed Pharmacother*. 143:112176. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112176>
 5. Viola TW, Nunes ML (2021) Social and environmental effects of the COVID-19 pandemic on children. *J Pediatr (Rio J)* S0021-7557(21):00122–00124. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2021.08.003>
 6. Kelvin AA, Halperin S (2020) COVID-19 in children: the link in the transmission chain. *Lancet Infect Dis* 20(6):633–634. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30236-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30236-X)
 7. Cao Q, Chen Y-C, Chen C-L, Chiu C-H (2020) SARS-CoV-2 infection in children: transmission dynamics and clinical characteristics. *J Formos Med Assoc* 119(3):670–673. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.02.009>
 8. Cavallo F, Rossi N, Chiarelli F (2020) Novel coronavirus infection and children. *Acta Biomed*. 91(2):172–176. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i2.9586>
 9. Davies NG, Klepac P, Liu Y, Prem K, Jit M (2020) CMMID COVID-19 working group, Eggo RM. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat Med* 26(8):1205–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0962-9>
 10. Munro APS, Faust SN (2020) Children are not COVID-19 super spreaders: time to go back to school. *Arch Dis Child* 105(7):618–619. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2020-319474>
 11. Alonso S, Alvarez-Lacalle E, Català M, Lopez D, Jordan I, García-García JJ, Soriano-Arandes A, Lazcano U, Salles P, Masats M, Urrutia J, Gatell A, Capdevila R, Soler-Palacin P, Bassat Q, Prats C (2021) Age-dependency of the propagation rate of coronavirus disease 2019 inside school bubble groups in Catalonia. *Spain Pediatr Infect Dis J* 40(11):955–961. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003279>
 12. Chen X, Ran L, Liu Q, Hu Q, Du X, Tan X (2020) Hand Hygiene, mask-wearing behaviors and its associated factors during the COVID-19 epidemic: a cross-sectional study among primary school students in Wuhan, China. *Int J Environ Res Public Health* 17(8):2893. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082893>
 13. Flasche S, Edmunds WJ (2021) The role of schools and school-aged children in SARS-CoV-2 transmission. *Lancet Infect Dis* 21(3):298–299. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30927-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30927-0)
 14. Dixon BC, Fischer RSB, Zhao H, O'Neal CS, Clugston JR, Gibbs SG (2021) Contact and SARS-CoV-2 infections among college football athletes in the Southeastern conference during the COVID-19 pandemic. *JAMA Netw Open* 4(10):e2135566. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.35566>
 15. O'Neal CS, Dixon BC, Fischer RSB (2022) College athletic programs thwart the spread of SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic. *JAMA Netw Open* 5(2):e2147810. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.47810>
 16. Dunton GF, Do B, Wang SD (2020) Early effects of the COVID-19 pandemic on physical activity and sedentary behavior in children living in the U.S. *BMC Public Health*. 20(1):1351. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09429-3>
 17. Meyer T, Mack D, Donde K, Harzer O, Krutsch W, Rössler A, Kimpel J, von Laer D, Gärtner BC (2021) Successful return to professional men's football (soccer) competition after the COVID-19 shutdown: a cohort study in the German Bundesliga. *Br J Sports Med* 55(1):62–66. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-103150>
 18. Strugnell R, Wang N (2021) Sustained neutralising antibodies in the Wuhan population suggest durable protection against SARS-CoV-2. *Lancet* 397(10279):1037–1039. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00434-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00434-7)
 19. Kim Y-I, Kim S-M, Park S-J et al (2021) Critical role of neutralizing antibody for SARS-CoV-2 reinfection and transmission. *Emerg Microbes Infect* 10(1):152–160. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1872352>
 20. Nettleton WD (2021) Interpreting SARS-CoV-2 diagnostic tests: common questions and answers. *Am Fam Physician* 103(8):465–472. PMID: 33856162
 21. Brotons P, Perez-Argüello A, Launes C et al (2021) Validation and implementation of a direct RT-qPCR method for rapid screening of SARS-CoV-2 infection by using non-invasive saliva samples. *Int J Infect Dis* 110(January):363–370. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.07.054>
 22. Asif IM, Chang CJ, Diamond AB, Raukar N, Zaremski JL (2020) Returning athletes back to high school sports in the COVID-19 era: preparing for the fall. *Sport Heal A Multidiscip Approach* 12(6):518–520. <https://doi.org/10.1177/1941738120953851>
 23. Slabaugh AD, Belk JW, Jackson JC, Robins RJ, McCarty EC, LeClere LE, Slabaugh MA (2021) Managing the return to football during the COVID-19 pandemic: a survey of the head team physicians of the football bowl subdivision programs. *Orthop J Sport Med* 9(1):232596712199204. <https://doi.org/10.1177/2325967121992045>
 24. Ajanovic S, Garrido-Aguirre J, Baro B et al (2021) How did the COVID-19 lockdown affect children and adolescents' well-being: Spanish parents, children, and adolescents respond. *Front Public Heal* 25(9):746052. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.746052>
 25. Meade J (2021) Mental health effects of the COVID-19 pandemic on children and adolescents. *Pediatr Clin North Am* 68(5):945–959. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2021.05.003>
 26. Wedel J, Steinmann P, Štrákl M, Hribersek M, Ravnik J (2021) Risk Assessment of infection by airborne droplets and aerosols at different levels of cardiovascular activity. *Arch Comput methods Eng* 28(6):4297–4316. <https://doi.org/10.1007/s11831-021-09613-7>
 27. Drezner JA, Drezner SM, Magner KN, Ayala JT (2021) COVID-19 surveillance in youth soccer during small group training: a safe return to sports activity. *Sport Heal A Multidiscip Approach* 13(1):15–17. <https://doi.org/10.1177/1941738120964458>
 28. Watson AM, Haraldsdottir K, Biese K, Goodavish L, Stevens B, McGuine T (2021) The association of COVID-19 incidence with sport and face mask use in United States high school athletes. *J Athl Train*. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-281-21>
 29. Lopez MJ, Mack C, Bliss T, Wasserman EB, Myers E, Solomon G, Lynch J, Casolaro A, Osterholm M, Hanfling D, Mayer T, Sills AK (2022) Observed versus expected COVID-19 infections among National Football League players during the 2020 season. *Epidemiology* 33(2):193–199. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000001416>
 30. Sasser P, McGuine T, Haraldsdottir K, Biese KM, Goodavish L, Stevens B, Watson AM (2021) Reported COVID-19 incidence in Wisconsin high school athletes in fall 2020. *J Athl Train* 57(1):59–64. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-0185.21>
 31. Yadav AK, Ghosh S, Kotwal A, Kaushik SK, Bobdey S, Sahu R, Kapoor S, Faujdar DS, Teli PT, Anand V (2021) Seroconversion among COVID-19 patients admitted in a dedicated COVID hospital: a longitudinal prospective study of 1000 patients. *Med J Armed Forces India* 77:S379–S384. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2021.06.007>

32. Herrington DM, Sanders JW, Wierzb TF et al (2021) Duration of SARS-CoV-2 sero-positivity in a large longitudinal sero-surveillance cohort: the COVID-19 Community Research Partnership. *BMC Infect Dis* 21(1):889. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06517-6>
33. Karachaliou M, Moncunill G, Espinosa A et al (2021) Infection induced SARS-CoV-2 seroprevalence and heterogeneity

of antibody responses in a general population cohort study in Catalonia Spain. *Sci Rep* 11(1):21571. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00807-4>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

María Hernández-García¹  · **Quique Bassat**^{1,2,3,4,5}  · **Victoria Fumado**^{3,6,7,8}  · **Gil Rodas**^{9,10}  · **Ramon Pi**¹⁰  · **Maite Miranda-García**^{7,11}  · **Mònica Girona-Alarcón**^{7,12}  · **Martí Català**¹³  · **Sergio Alonso**¹⁴  · **Enrique Alvarez-Lacalle**¹⁴  · **Daniel López**¹⁴  · **Maria Melé-Casas**¹  · **Gemma Pons-Tomas**¹  · **Mariona F. de Sevilla**^{1,3,7,8}  · **Elisenda Bonet-Carne**^{7,15,16,17}  · **Claudia Fortuny**^{3,6,7,8}  · **Aleix García-Miquel**^{11,15}  · **Cristina Jou**^{7,18,19}  · **Cristina Adroher**²⁰  · **Joana Claverol**^{7,11}  · **Marta Cubells**^{7,11}  · **Anna Codina**^{7,18}  · **Daniel Cuadras**²¹  · **Eduard Gratacós**^{7,15,16,19}  · **Pedro Brotons**^{3,7,22}  · **Carmen Muñoz-Almagro**^{3,22,23}  · **Clara Prats**¹⁴  · **Juan José García-García**^{1,3,7,8}  · **Iolanda Jordan**^{3,7,8,12} 

María Hernández-García
maria.hernandezg@sjd.es

Quique Bassat
quique.bassat@isglobal.org

Victoria Fumado
victoria.fumado@sjd.es

Gil Rodas
gil.rodas@fcbarcelona.cat

Ramon Pi
ramon.pi@fcbarcelona.cat

Maite Miranda-García
maite.miranda@sjd.es

Mònica Girona-Alarcón
monica.girona@sjd.es

Martí Català
marticatalasabate@gmail.com

Sergio Alonso
s.alonso@upc.edu

Enrique Alvarez-Lacalle
enric.alvarez@upc.edu

Daniel López
daniel.lopez-codina@upc.edu

Maria Melé-Casas
maria.mele@sjd.es

Gemma Pons-Tomas
gemma.pons@sjd.es

Mariona F. de Sevilla
mariona.fernandez@sjd.es

Elisenda Bonet-Carne
elisenda.bonet@sjd.es

Claudia Fortuny
claudia.fortuny@sjd.es

Aleix García-Miquel
garcia.aleix@gmail.com

Cristina Jou
cristina.jou@sjd.es

Cristina Adroher
cristina.adroher@sjd.es

Joana Claverol
joana.claverol@sjd.es

Marta Cubells
marta.cubells@sjd.es

Anna Codina
anna.codina@sjd.es

Daniel Cuadras
danicuadras@gmail.com

Eduard Gratacós
eduard.gratacos@sjd.es

Pedro Brotons
pedro.brotons@sjd.es

Carmen Muñoz-Almagro
carmen.munoza@sjd.es

Clara Prats
clara.prats@upc.edu

Iolanda Jordan
iolanda.jordan@ub.edu; yolanda.jordan@sjd.es

¹ Paediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Passeig Sant Joan de Déu, Number 2, Barcelona, Esplugues de Llobregat 08950, Spain

² ISGlobal, Barcelona Institute for Global Health, Barcelona, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología Y Salud Pública (CIBER-ESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

- ⁴ Centro de Investigação Em Saúde de Manhica (CISM), Maputo, Mozambique
- ⁵ Catalan Institution for Research and Advanced Studies, ICREA, Barcelona, Spain
- ⁶ Infectious Diseases Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁷ Infectious Diseases and Microbiome, Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Barcelona, Spain
- ⁸ Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁹ Sports Medicine Unit, Hospital Clinic and Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁰ Medical Department, Futbol Club Barcelona, Barça Innovation Hub, Barcelona, Spain
- ¹¹ Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ¹² Paediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹³ Nuffield Department of Orthopaedics, Rheumatology and Musculoskeletal Sciences (NDORMS), University of Oxford, Oxford, UK
- ¹⁴ Computational Biology and Complex Systems (BIOCOM-SC), Department of Physics, Universitat Politècnica de Catalunya, Castelldefels, Spain
- ¹⁵ BCNatal Fetal Medicine Research Center, Hospital Clinic and Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁶ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain
- ¹⁷ Universitat Politècnica de Catalunya • BarcelonaTech, Barcelona, Spain
- ¹⁸ Department of Pathology and Biobank, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁹ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
- ²⁰ Strategic Planning and Management Control, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain
- ²¹ Statistics Department, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- ²² Department of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain
- ²³ RDI Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain

COORDINATION AND INFORMATION PROTOCOL IN POSITIVE COVID-19 CASES DURING THE STUDIED PERIOD

Supplementary file 1.

Players who are participating in the Sant Joan de Déu Hospital study of COVID-19 in the facilities of the Barcelona Football Club (BFC) have to attend the tests on the day that corresponds to each group.

Once the responsible doctor has the results of the tests, the COMMUNICATION OF A POSITIVE CASE must be performed as follows (see Figure 1 at the end):

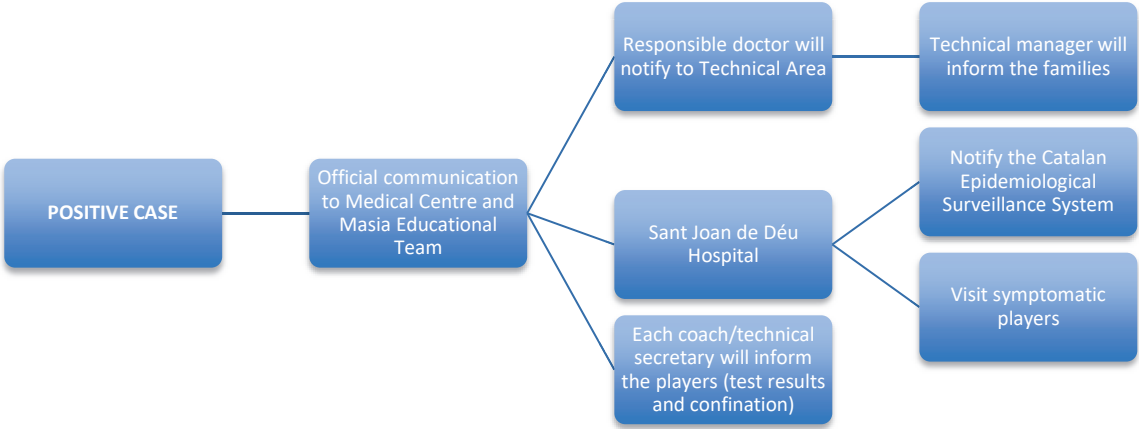
- In the event that a positive case has been detected, the official communication will be sent to the Medical Centre and the Masia Educational Team.
- The responsible doctor will in turn notify the person in charge of the technical area. The technical manager of each section must inform the families of:
 - o The result of the test.
 - o That Sant Joan de Déu Hospital will notify the Catalan Epidemiological Surveillance System.
 - o That if the player has symptoms, he will be visited by a pediatrician at Sant Joan de Déu Hospital.
 - o That if they have any medical questions, they can contact the doctor responsible for their section and team.
 - o That if the player is a resident at The Masia: they can come to pick up their children (being close contact or positive). In no case is it an obligation, but it is a recommendation.
- On the other hand, the secretary must notify the technician responsible for the team of the positive or close contact player. It will be the coach/technical secretary who will contact the players to notify the result of the tests and inform that they have to confine themselves to their home/room.

When it comes to report the players who end the isolation, each case and sport will have to be studied case by case. In this case, the responsible doctor will be the one to inform the medical/sports department and residence (respectively) about the dates of ending the confinement. It will be the technical part who informs the player.

In the case of La Masia residents, the criteria and the logistics established are as follows:

- Isolated positive cases or close contacts in quarantine will remain confined to their rooms. If the availability of rooms allows it, individually.
- They will eat in their room.
- They will be allowed to go out to the outdoor garden area at some time during the day, at a time set by the Masia Educational Team (this time will be when they do not coincide with any non-confined resident).
- They will go out in small groups, carrying FFP2 masks and keeping a safe distance from other people, not being able to go out at the same time the positive players with the isolated ones.
- In the event that there are two positive players from different sections and there are no free rooms to separate the roommates, the two positive players will be confined in the same room.
- Continuous and direct contact will be maintained with families and players to accompany them as much as possible in the isolation period.

COORDINATION AND INFORMATION PROTOCOL IN POSITIVE COVID-19 CASES DURING THE STUDIED PERIOD



TRAINING PROTOCOL DURING COVID-19 PANDEMIC IN BARCELONA FOOTBALL CLUB

Supplementary File 2.

The aim of this document is to establish the rules and preventive and health measures that will be carried out in the field of the Barcelona Football Club (BFC) teams on their training, with the main objective of reducing the risk of transmission of SARS-CoV-2. This document may undergo modifications depending on the evolution of the epidemiological situation and the sanitary regulations.

The basic principles that will guide this document will be:

- Guarantee the safety and health of the players and the coaching staff.
- Guarantee the safety and health of all workers who interact with the players and the coaching staff.
- Guarantee the safety and health of the surroundings of the FC Barcelona facilities.
- Promote personal and collective protection and hygiene measures against the transmission of SARS-CoV-2.

This document will establish the guidelines for the return to training in the base teams, which will be carried out in 3 phases:

- Phase 1. Initial assessment
- Phase 2. Establishment of stable coexistence teams
- Phase 3. Training of stable coexistence teams

Phase 1. Initial assessment

Before the start of the date of the first training session, all the participants, players or coaching staff, must declare in a responsible manner that in the last 14 days:

- they have not had symptoms compatible with COVID-19
- they have not been diagnosed with the disease
- they have not lived with people who have been ill
- they have not had close contact with people affected by the disease.

Any participant who is suspected or confirmed to present the infection, or who has been close contact of a confirmed case in the last 14 days, will not be able to start the training and must communicate it to the responsible doctor and the COVID-19 cases medical manager as soon as possible.

Phase 2. Establishment of stable coexistence teams

To maintain safe environments and respecting current regulations, teams, defined as stable sport-specific groups (SSG), will be established. Teams are groups formed by athletes and coaching staff who, continuously, have close contact during the sports training, and cannot guarantee the interpersonal safety distance and the use of face mask.

In order to establish a team, none of its members should present symptoms of COVID-19 during the group's stabilization period, which is 14 days. Accordingly, special care measures should be taken during these first 14 days.

The establishment of the teams will prevent possible transmission of SARS-CoV-2 and will ensure the traceability of stable groups by identifying athletes and coaching staff, their symptoms and their possible risk contacts.

TRAINING PROTOCOL DURING COVID-19 PANDEMIC IN BARCELONA FOOTBALL CLUB

During the teams establishment period, the training activities should be carried out sequentially:

- 1st week: individual work respecting the interpersonal safety distance and avoiding physical contact.
- 2nd week: work phase in groups.

After the first 14 days, if there is no positive or suspicious case, or close contact, the team may be considered established and Phase 3 may start (see following section).

If, during this period, there is a positive case, close contact or someone showing symptoms, it should be reported immediately to the responsible doctor and the COVID-19 cases medical manager. Likewise, activities will be suspended and an analysis of the situation will be carried out to take the pertinent measures.

Phase 3. Training of stable coexistence teams

Once the teams have been established, the training activities can be carried out without maintaining of interpersonal safety distance and the strict use of face mask, assuming possible physical contact between the players. The coaching staff must maintain, as far as possible, the use of a face mask and interpersonal distance during training sessions. Each team will have a defined training schedule and a determined changing room. Since the teams seek to limit the number of people affected in the case of having a positive case, it is highly recommended to not have interactions between different teams. In cases where a player has to carry out activities with a different team, the risk and need must be previously assessed by the doctor responsible for the section.

General rules within the facilities:

- An access point to the facilities will be established. At this point the player/staff will be identified, their data will be recorded and their body temperature will be taken using a laser thermometer.
 - If the temperature is $\leq 36.9^{\circ}\text{C}$, the access will be allowed by giving an identification bracelet, which will be different every day, and which will indicate that that player/staff has successfully passed through the control point. Every player/staff must wear the bracelet at all times within the club's facilities. At the same access point, the player/staff must wear a hygienic mask and must clean his/her hands with hydroalcoholic solution.
 - In the event that the player/staff has a temperature $\geq 37^{\circ}\text{C}$, entry to the facilities will be denied and he/she will be instructed to medical assessment by the responsible doctor from the Medical Centre. In cases when the Medical Centre is closed, the COVID-19 cases medical manager will be notified via telephone, who will make the pertinent indications and recommendations to carry out the medical evaluation.
- Before training, the players/staff must notify the section doctor or physiotherapist if they present any symptoms suggestive of COVID-19 infection (headache, cough, sneezing, mucus, sore throat, diarrhea, fever, loss of smell or loss of taste. In these cases, the person will not be able to start sports activities, will immediately leave the team and will be referred to the Medical Center for the corresponding evaluation. In the event that the Medical Center is closed, the

TRAINING PROTOCOL DURING COVID-19 PANDEMIC IN BARCELONA FOOTBALL CLUB

case will be communicated to the COVID-19 cases medical manager, who will indicate the actions to be followed.

- The training will begin progressively team after team, which will allow avoiding a high concentration of people at the same place and time, and also will avoid crossing between the groups, as well as having a better traceability in case of having a suspicious positive case.
- The spaces for each team will be sectorized. Circulation circuits will be one-way and crossings with other teams will be avoided.
- Within the facilities, all persons must wear a mask, covering the mouth and nose, must maintain a minimum interpersonal distance of 1.5 meters and must use hydroalcoholic solutions.
- Within the facilities there will be posters and informative infographics of basic and essential hygiene measures.
- Family members or other people not included in the team will not be allowed in the training sessions.
- All the facilities where the trainings will take place and the material to be used will be well established. The facilities of each team will be for their exclusive use, and will be isolated from other people, with the exception of the essential personal for disinfection, cleaning, organization and surveillance.
- Daily specific cleaning and disinfection of the facilities will be carried out, both indoors and outdoors. The entire facility will be ventilated frequently.
- Only one player may be performing treatment in the physiotherapy room. Both the physiotherapist and the player must wear the mask at all times.
- No person may access, transit, use or remain in the medical area or the physiotherapy room except with the express permission of the responsible doctor, the COVID-19 cases medical manager, the responsible physiotherapist or the person in charge of the facility, in this order.
- Video rooms and common areas cannot be used.
- It won't be allowed to eat or drink inside the facilities, except during training sessions. Each player must have his/her own bottle of water, which must be correctly identified.
- No items for personal use may be shared.

Management of suspected and confirmed COVID-19 cases:

- In the event that a player/staff presents symptoms compatible with COVID-19, the doctor in charge of the section and the COVID-19 cases medical manager must be notified immediately.
- No person with symptoms compatible with COVID-19 will be able to enter to the training facilities and will not be able to be in contact with their team, until they have the corresponding medical evaluation. The responsible physician, together with the COVID-19 cases medical manager, will decide where will be the assessment carried out.
- Suspected cases of COVID-19 infection must carry out the diagnostic test and must do home isolation pending the result of the test. At that time, the search for close contacts within the training environment, including the team, will begin.
 - o If the test result is negative and clinical suspicion is low, infection will be ruled out and isolation may be finished.

TRAINING PROTOCOL DURING COVID-19 PANDEMIC IN BARCELONA FOOTBALL CLUB

- In the event that the test result is positive, the isolation will be maintained, which will last up to three days after the resolution of the fever and the symptoms, with a minimum of 10 days from the onset of the symptoms. In asymptomatic cases, the isolation will be maintained until 10 days after the date of taking the sample for diagnosis.
- All the team that belongs to the positive case, as well as their close contacts of the 48 hours prior to the onset of symptoms or the confirmation of the test in the case of asymptomatic patients, must performed the corresponding diagnostic test and must do the corresponding home isolation until the result of the test.
 - If the test is negative, the isolation will be maintained for up to 14 days from the last contact.
 - If the test is positive, it will be considered a confirmed case and the corresponding actions must be carried out.
- If a player or staff is in close contact with a person with a confirmed infection who does not belong to the club environment, he/she must communicate this immediately to the responsible physician and the COVID-19 cases medical manager, and will not be able to enter to the training facilities or be in contact with his/her team, until the result of the diagnostic tests of the index case is known.

Supplementary File 3: Methods calculations

With the aim of identifying when transmission was significant and led to local outbreaks, we determined the expected number of cases to be found in each screening according to the surrounding incidence. We used the number of diagnosed cases in Catalonia by age groups [<https://dadescovid.cat/descarregues?lang=eng>]. In our analysis, three different age groups were considered: 10 – 19, 20 – 29 and ≥ 30 . The number of expected cases at time t , $n(t)$, was computed as:

$$n(t) = \sum_{\substack{10-19, \\ 20-29, \geq 30}} T_i(t) \cdot C7_i(t),$$

where T_i is the number of screening tests for i age group at day t and $C7_i$ is the number of cases detected among general population during the last seven days ($t, t-1, \dots, t-6$) for i age group divided by the population of Catalonia of this age group.

The probability to find k positives, $Prob(k)$, was defined as:

$$Prob(k, t) = \sum_{j_1 + j_2 + j_3 = k} P_{10-19}(j_1, t) \cdot P_{20-29}(j_2, t) \cdot P_{\geq 30}(j_3, t),$$

where $P_i(j, t)$ is the probability to find j positives in the i age group, which can be computed as:

$$P_i(j, t) = \binom{T_i(t)}{j} \cdot C7_i(t)^j \cdot (1 - C7_i(t))^{T_i(t)-j},$$

where $\binom{n}{k}$ is the binomial coefficient. This probability of finding a given number of positives in the general population was compared with the actual number of cases found in the FCB setting to assess and compare the levels of transmission.

Supplementary File 4: Pairwise comparisons of Attack Rates

Table 3. Comparison of the attack rates (AR) between all the participants from recruitment pathway 1 (RP1) and recruitment pathway 2 (RP2).

There were more cases of infection among participants from RP1 than among participants from RP2, the difference is significant (ODDs ratio 3.7 [1.8-7.6]).

RP1 vs. RP2 (all the participants in the study)					
Cohort	n	Positives	Attack Rate	p-value	ODDs ratio
RP1	70	21	30%	<0.01	3.7059 [1.8101-7.5872]
RP2	164	17	10%	<0.01	0.2698 [0.1318-0.5525]
Total	234	38	16%		

Table 4. Comparison of the attack rates (AR) between workers and players (=residents) from RP1 (La Masia).

There were more cases of infection among La Masia residents than among La Masia workers, the difference is significant (ODDs ratio 13.7 [1.8-107.1]).

Workers and residents in La Masia (RP1)					
Cohort	n	Positives	Attack Rate	p-value	ODDs ratio
Worker	33	1	3%	<0.01	0.0729 [0.0093-0.5692]
Resident	70	21	30%	<0.01	13.7143 [1.7568-107.0601]
Total	103	22	21%		

Table 5. Comparison of the attack rates (AR) between the participants from the seven complete monitored teams that belonged to RP1 vs. RP2.

Among participants from the seven complete monitored teams, the AR was significantly higher in those who live in La Masia (RP1) compared to those who do not reside there (RP2), with a p-value < 0.01, and ODDS 3.6 [1.6-8.2].

RP1 vs. RP2 (only participants from the 7 complete monitored teams)					
Cohort	n	Positives	Attack Rate	p-value	ODDs ratio
RP1 (La Masia)	43	15	35%	<0.01	3.5714 [1.5583-8.1850]
RP2	115	15	13%	<0.01	0.2800 [0.1222-0.6417]
Total	158	30	19%		

Table 6. Comparison of the attack rates (AR) between all the participants from the seven complete monitored teams (from both RP1 and RP2).

The Senior youth basketball team had the highest AR among all complete monitored teams, with a p-value <0.01 and an ODDS ratio of 12.3 [3.8-39.7]. Among the rest of the monitored teams there were no significant differences in terms of AR.

7 complete monitored teams						
Cohort		n	Positives	Attack Rate	p-value	ODDs ratio
Men Outdoor Football	Senior youth A	35	5	14%	0.4763	0.6533 [0.2301-1.8552]
	Senior youth B	33	8	24%	0.4543	1.4982 [0.5973-3.7580]
	Junior youth A	26	2	8%	0.1691	0.3095 [0.0690-1.3895]
Women Outdoor Football	Reserve	21	2	10%	0.3705	0.4098 [0.0901-1.8643]
	Senior youth	13	1	8%	0.4647	0.3333 [0.0416-2.6686]
Basketball	Reserve	15	2	13%	0.7380	0.6319 [0.1348-2.9620]
	Senior youth	15	10	67%	<0.01	12.3000 [3.8064-39.7464]
Total		158	30	19%		

Table 7. Comparison of the attack rates (AR) between the participants from the seven complete monitored teams that belonged to RP1 (La Masia).

There were no significant differences in ARs between the RP1 participants from the seven complete monitored teams (no differences between residents in La Masia depending on which team/sport they played).

Participants from the 7 complete monitored teams, that live at La Masia (RP1)						
Cohort		n	Positives	Attack Rate	p-value	ODDs ratio
Men Outdoor Football	Senior youth A	8	2	25%	0.6916	0.5641 [0.0989-3.2171]
	Senior youth B	20	7	35%	1.0000	1.0096 [0.2872-3.5494]
	Junior youth A	5	0	0%	0.1449	NA
Women Outdoor Football	Reserve	0	0	NA	NA	NA
	Senior youth	0	0	NA	NA	NA
Basketball	Reserve	2	1	50%	1.0000	1.9286 [0.1120-33.2069]
	Senior youth	8	5	63%	0.1036	4.1667 [0.8343-20.8093]
Total		43	15	35%		

Table 8. Comparison of the attack rates (AR) between the participants from the seven complete monitored teams that belonged to RP2.

Among the RP2 participants (who did NOT live in La Masia), from the seven complete monitored teams, the team with a higher AR with p -value < 0.01 was the Senior youth basketball team, with an ODDS of 24.5 [4.2-143.0]. Among the rest of the RP2 participants, there were no significant AR differences.

Participants from the 7 complete monitored teams, that live at their own homes (RP2)						
Cohort		n	Positives	Attack Rate	p-value	ODDs ratio
Men Outdoor Football	Senior youth A	27	3	11%	1.0000	0.7917 [0.2061-3.0410]
	Senior youth B	13	1	8%	1.0000	0.5238 [0.0631-4.3487]
	Junior youth A	21	2	10%	0.7350	0.6559 [0.1364-3.1535]
Women Outdoor Football	Reserve	21	2	10%	0.7350	0.6559 [0.1364-3.1535]
	Senior youth	13	1	8%	1.0000	0.5238 [0.0631-4.3487]
Basketball	Reserve	13	1	8%	1.0000	0.5238 [0.0631-4.3487]
	Senior youth	7	5	71%	<0.01	24.5000 [4.1975-143.0026]
Total		115	15	13%		

4.5. Quinto estudio

El quinto estudio responde al siguiente objetivo:

- 2.2. Evaluar la utilidad de la saliva como muestra para el estudio serológico de la transmisión del SARS-CoV-2, en comparación con suero/plasma (técnica *gold-standard*).

Dobaño C, Alonso S, Vidal M, Jiménez A, Rubio R, Santano R, Barrios D, Pons Tomas G, Melé Casas M, Hernández García M, Girona-Alarcón M, Puyol L, Baro B, Millat-Martínez P, Ajanovic S, Balanza N, Arias S, Rodrigo Melero N, Carolis C, García-Miquel A, Bonet-Carné E, Claverol J, Cubells M, Fortuny C, Fumadó V, Codina A, Bassat Q, Muñoz-Almagro C, Fernández de Sevilla M, Gratacós E, Izquierdo L, García-García JJ, Aguilar R, Jordan I, Moncunill G. Multiplex Antibody Analysis of IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in Saliva and Serum from Infected Children and Their Close Contacts. *Frontiers in Immunology*. 2022 Jan 27;13:751705. doi: 10.3389/fimmu.2022.751705. PMID: 35154094; PMCID: PMC8828491.

Resumen:

Introducción: La COVID-19 afecta en menor medida a los niños respecto a los adultos, aun así los primeros pueden infectarse y transmitir el SARS-CoV-2 a sus contactos. Son necesarias técnicas de diagnóstico sensible no invasivo para evaluar la dinámica de infectividad del SARS-CoV-2 en los pacientes pediátricos y así poder guiar las intervenciones de salud pública, particularmente en esta población que no estaba completamente vacunada en el momento del estudio.

Objetivo: Evaluar la utilidad de los ensayos de detección de anticuerpos basados en tecnología *Luminex* (técnica de alto rendimiento produce resultados comparables a los ensayos ELISA) que cuantifican los niveles de IgM, IgA e IgG contra varios antígenos del SARS-CoV-2 en muestras de saliva de niños y adultos infectados y no infectados, y compararlos con muestras de suero/plasma de los mismos pacientes.

Material y métodos: Estudio longitudinal de contactos e infectividad llevado a cabo en 122 individuos (52 niños y 70 adultos). Comparamos muestras de saliva versus muestras de suero/plasma en niños infectados y adultos diagnosticados mediante RT-PCR semanal durante 35 días (n = 62), y aquellos que consistentemente dieron negativo durante el mismo período de seguimiento (n = 60), en el verano de 2020 en Barcelona, España.

Resultados: Los niveles de anticuerpos en saliva de los pacientes infectados fueron significativamente mayores respecto a los de los pacientes no infectados, mostrando una correlación con lo medido en suero/plasma. Los pacientes asintomáticos tuvieron niveles mayores de IgG anti-*Spike* respecto a los pacientes sintomáticos, lo que sugería que estos anticuerpos podrían tener un papel protector contra la enfermedad. También se observaron niveles mayores de IgG anti-*Spike* en suero/plasma y de IgM anti-*Spike* en saliva de niños infectados, en comparación con adultos infectados, lo que podría relacionarse con una mayor inmunidad en los pacientes pediátricos. Por último, con respecto a los niños infectados, los varones tuvieron niveles mayores de IgG anti-Nucleocápside y anti-RBD en saliva, en comparación con las mujeres.

A pesar de una buena correlación general entre los ensayos de anticuerpos realizados en saliva y los realizados en suero/pasma, el análisis de agrupamiento individual sugirió que las respuestas de anticuerpos que pueden no detectarse en sangre podrían detectarse en saliva, y viceversa.

Conclusiones: La técnica no invasiva de medición de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en saliva debería ser considerada como complementaria a las técnicas realizadas en suero/plasma, para poder determinar la prevalencia y transmisión del SARS-CoV-2 en la población pediátrica.



OPEN ACCESS

Edited by:

Tomer Hertz,
Ben-Gurion University of the Negev,
Israel

Reviewed by:

Luminița-Smaranda Iancu,
Grigore T. Popa University of Medicine
and Pharmacy, Romania
Massimo Pieri,
University of Rome Tor Vergata, Italy

*Correspondence:

Carlota Dobaño
Carlota.dobano@isglobal.org
Gemma Moncunill
Gemma.moncunill@isglobal.org

[†]These authors share first authorship

[‡]These authors share senior authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 August 2021

Accepted: 06 January 2022

Published: 27 January 2022

Citation:

Dobaño C, Alonso S, Vidal M,
Jiménez A, Rubio R, Santano R,
Barrios D, Pons Tomas G,
Melé Casas M, Hernández García M,
Girona-Alarcón M, Puyol L, Baro B,
Millat-Martínez P, Ajanovic S,
Balanza N, Arias S, Rodrigo Melero N,
Carolís C, García-Miquel A,
Bonet-Carné E, Claverol J, Cubells M,
Fortuny C, Fumadó V, Codina A,
Bassat Q, Muñoz-Almagro C,
Fernández de Sevilla M, Gratacós E,
Izquierdo L, García-García JJ,
Aguilar R, Jordan I and Moncunill G
(2022) Multiplex Antibody Analysis of
IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in
Saliva and Serum From Infected
Children and Their Close Contacts.
Front. Immunol. 13:751705.
doi: 10.3389/fimmu.2022.751705

Multiplex Antibody Analysis of IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in Saliva and Serum From Infected Children and Their Close Contacts

Carlota Dobaño^{1,2*†}, Selenia Alonso^{1†}, Marta Vidal¹, Alfons Jiménez^{1,3}, Rocío Rubio¹, Rebeca Santano¹, Diana Barrios¹, Gemma Pons Tomas⁴, María Melé Casas⁴, María Hernández García⁴, Mònica Girona-Alarcón^{5,6}, Laura Puyol¹, Barbara Baro¹, Pere Millat-Martínez¹, Sara Ajanovic¹, Núria Balanza¹, Sara Arias¹, Natalia Rodrigo Melero⁷, Carlo Carolís⁷, Aleix García-Miquel⁸, Elisenda Bonet-Carné^{8,9,10}, Joana Claverol^{5,11}, Marta Cubells^{5,11}, Claudia Fortuny^{5,12}, Victoria Fumadó^{5,12}, Anna Codina¹³, Quique Bassat^{1,3,4,14,15}, Carmen Muñoz-Almagro^{3,5,16,17}, Mariona Fernández de Sevilla^{3,4,5}, Eduard Gratacós^{8,9,18}, Luis Izquierdo^{1,2}, Juan José García-García^{3,4,5}, Ruth Aguilar¹, Iolanda Jordan^{3,5,6‡} and Gemma Moncunill^{1,2*†}

¹ ISGlobal, Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Consorcio de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Infecciosas, Madrid, Spain, ³ Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain, ⁴ Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Esplugues, Spain, ⁵ Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues, Spain, ⁶ Paediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷ Biomolecular Screening and Protein Technologies Unit, Centre for Genomic Regulation (CRG), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain, ⁸ Fetal Medicine Research Center (Hospital Clínic and Hospital Sant Joan de Déu), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ¹⁰ Universitat Politècnica de Catalunya, BarcelonaTech, Barcelona, Spain, ¹¹ Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, ¹² Infectious Diseases Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, ¹³ Biobank Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, ¹⁴ Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), Maputo, Mozambique, ¹⁵ Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain, ¹⁶ Department of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain, ¹⁷ Molecular Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues, Spain, ¹⁸ Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Madrid, Spain

COVID-19 affects children to a lesser extent than adults but they can still get infected and transmit SARS-CoV-2 to their contacts. Field deployable non-invasive sensitive diagnostic techniques are needed to evaluate the infectivity dynamics of SARS-CoV-2 in pediatric populations and guide public health interventions, particularly if this population is not fully vaccinated. We evaluated the utility of high-throughput Luminex assays to quantify saliva IgM, IgA and IgG antibodies against five SARS-CoV-2 spike (S) and nucleocapsid (N) antigens in a contacts and infectivity longitudinal study in 122 individuals (52 children and 70 adults). We compared saliva versus serum/plasma samples in infected children and adults diagnosed by weekly RT-PCR over 35 days (n=62), and those who consistently tested negative over the same follow up period (n=60), in the Summer of 2020 in Barcelona, Spain. Saliva antibody levels in SARS-CoV-2 RT-PCR positive individuals were significantly higher than in negative individuals and correlated with those measured in sera/plasmas. Asymptomatic infected individuals had higher levels of anti-S IgG than symptomatic individuals, suggesting a protective anti-disease role for antibodies. Higher

anti-S IgG and IgM levels in serum/plasma and saliva, respectively, in infected children compared to infected adults could also be related to stronger clinical immunity in them. Among infected children, males had higher levels of saliva IgG to N and RBD than females. Despite overall correlation, individual clustering analysis suggested that responses that may not be detected in blood could be patent in saliva, and vice versa.

In conclusion, measurement of SARS-CoV-2-specific saliva antibodies should be considered as a complementary non-invasive assay to serum/plasma to determine COVID-19 prevalence and transmission in pediatric populations before and after vaccination campaigns.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, saliva, antibody - antigen complex, children, plasma, serum, surveillance

INTRODUCTION

Since the start of the COVID-19 pandemic, it has become apparent that pediatric populations are less affected than adult or older populations (1, 2), although studies have also found children and adults to be infected to a similar low degree (3). Clinical presentation of SARS-CoV-2 infection is milder in children, with more proportion of asymptomatic cases (1, 4–6). One hypothesis for this lower severity of COVID-19 is the protective effect that antibodies from human coronaviruses of the common cold (HCoV), which are more prevalent in children, could exert on SARS-CoV-2 control, considering cross-reactivity between them (7, 8). Children could also be harboring lower viral loads, in part due to the lower expression of ACE2, receptor of the coronavirus (9). This implies that highly sensitive techniques might be required for its accurate diagnosis.

In this context, a question of high interest has been whether children who become infected might be less efficient transmitters to their immediate contacts (10), as this has important implications for the management of outbreaks in schools, extracurricular activities, and holiday camps, particularly when children are not prioritized for vaccination campaigns. Having field deployable diagnostic tools to monitor infectivity dynamics in school-like environments is therefore very relevant from the public health perspective.

The presence of the virus in nasal or nasopharyngeal samples can be detected with real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and antigen-based sensitive methods, while prior exposure has to be assessed by detecting antibodies to SARS-CoV-2 antigens. The latter is usually done by measuring specific immunoglobulins in serum or plasma samples, which requires obtaining blood samples by venous or capillary punctures, less amenable to large field studies. Several commercial rapid diagnostic tests (RDT) exist that are useful as point of care kits, but they may be limited by their sensitivity and specificity in the case of asymptomatic infections, which usually induce lower levels of antibodies (11, 12). A number of laboratory-based serological assays (ELISA, CLIA) are also widely used and with good performances (13). The pooled sensitivity of ELISAs measuring IgG or IgM has been reported as 84.3% (95% confidence interval 75.6% to 90.9%), and of CLIAs as 97.8% (46.2% to 100%). Pooled specificities ranged from 96.6% to 99.7%. Similarly, multiplex assays combining multiple antigenic specificities

simultaneously and amenable for high-throughput testing, offer even better potential to have the highest sensitivity to detect low-level responses in younger populations.

Being a respiratory pathogen, the mucosal immunity has a key importance, and thus the role of IgA in controlling the virus is becoming increasingly important (14). Therefore, saliva is an attractive sample matrix for developing field-deployable non-invasive serological assays that are readily applicable in pediatric surveys (15–17). Indeed, antibodies in saliva have been detected in COVID-19 patients and correlate with plasma antibodies (18). Consequently, the availability of highly sensitive and specific antibody assays for immunological profiling is valuable both for immune-epidemiological surveys and to better understand protective immunity to SARS-CoV-2 (19). In addition, saliva serology would allow knowing the serological diagnosis after the vaccination for determining the levels of immunity at individual level and in the population, and could be really helpful in population screening for determining SARS-CoV-2 seroprevalence in children populations.

In this study we adapted and evaluated three Luminex-based antibody assays to quantify the levels of IgM, IgA and IgG against several SARS-CoV-2 antigens in saliva samples, and compared them to the levels of antibodies obtained using serum/plasma samples from the same individuals who had a positive or negative RT-PCR diagnosis over a five week follow up period. We tested the applicability of the Luminex saliva assays in children and adult volunteers, having different demographic characteristics and clinical presentations, participating in a contacts and infectivity study after the first peak of the COVID-19 pandemic in the Summer of 2020 in Barcelona.

MATERIALS AND METHODS

Study Design, Human Subjects and Samples

We compared the levels of SARS-CoV-2 antibodies in subjects with a positive diagnosis by nasopharyngeal RT-PCR and/or ELISA SARS-CoV-2 IgG, IgM test (Euroimmune Architect – Abbott) independently of the presence of COVID-19 compatible symptoms and subjects with negative nasopharyngeal RT-PCR

(20) and serology by RDT (SureScreen). Eligible subjects entered the study *via* three recruitment pathways: (i) active surveillance in 22 Summer schools, as previously reported (21), (ii) passive detection of cases coming from other school-like environments, referred from the Catalan health surveillance system call, and (iii) individual cases referred from an announcement made to enroll children with positive RT-PCR in the previous 5 days. Symptomatic children were defined as those with acute respiratory infection including fever, cough, headache, gastrointestinal symptoms, rhinorrhea or nasal congestion, anosmia or ageusia, dyspnea, and myalgia. There were 70 adults (25 males and 45 females) and 52 children (26 males and 26 females) recruited. Participants were followed up for 5 weeks over July 2020, with weekly blood and saliva sample collection and RT-PCR testing that allowed accurately defining the infected positive and negative groups. Saliva samples were collected with Oracol devices (Malvern Medical Development, UK) for optimal harvesting of crevicular fluid, enriched with serum antibodies (22, 23). Blood samples were collected by venipuncture and plasma or serum separated by centrifugation and frozen on the same day, or as dried blood spots (DBS) to facilitate the field survey logistics. Blood EDTA tubes were kept in the fridge until centrifugation at 1721g for 10 min to separate the plasma fraction. DBS were stored at -20°C until the day of serum extraction, when they were brought up to room temperature, and mixed with elution buffer (Luminex buffer with 0.05% Tween-20) at 4°C overnight with agitation at 600 rpm. On the next day, tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min to harvest the serum. Plasma and DBS serum eluate samples were stored at -80°C until serological analysis. Oracol devices were kept and transported refrigerated to the lab on the same day, for centrifugation into a cryotube at 1500g for 10 min, heat inactivated at 55°C for 30 min, and frozen at -20°C until antibody measurements. Thirty-six pre-pandemic plasmas from healthy adults were used as negative controls and to calculate the seropositivity cutoff for sera/plasmas. No pre-pandemic saliva samples were available after contacting national biobanks.

Measurement of Antibodies

Quantitative suspension array technology (qSAT) assays to measure IgM, IgA and IgG against SARS-CoV-2 were adapted from our previous standardized serum/plasma protocols (24) to a saliva matrix for SARS-CoV-2 antibody evaluation. Antigens included the nucleocapsid (N) full-length (FL) and C-terminus (amino acid residues 340-416, CT) (25), the spike (S) FL produced at CRG, S2 purchased from SinoBiologicals, and RBD donated by F. Krammer (Mount Sinai, NY). Briefly, proteins coupled to magnetic microspheres (Luminex Corporation, Austin, TX) were incubated with serum/plasma (1/500 dilution) or saliva samples (1/5 or 1/10 dilutions, **Figure S1**) or blank controls in 384-well plates. Saliva dilution of 1/10 showed higher sensitivity and was selected for further assays. The impact of heat inactivation was previously checked in serum/plasma and saliva (**Figure S2**), with a decrease in the levels of IgM to RBD and S in saliva. Serum was eluted from DBS with 200 µl of PBS-BN (filtrated PBS with 1% BSA and 0.05% sodium azide, MilliporeSigma, St. Louis, USA) + 0.05% Tween20.

Considering a hematocrit of 50% results in an eluted protein concentration equivalent to a serum/plasma dilution of 1:50, which was subsequently diluted to 1:500 for the assay. Antibodies in serum eluted from DBS and from serum/plasma samples are shown together since no differences were observed in the available paired samples of plasma and DBS. After antigen-coupled beads were incubated with samples, plates were washed and phycoerythrin-labeled secondary antibodies (anti-human IgG, IgM, or IgA, Moss) added. Finally, beads were washed, resuspended and acquired in a FlexMap 3D xMAP® instrument. Crude median fluorescent intensities (MFI) and background fluorescence from blank wells were exported using the xPONENT software.

Data Analysis

To verify the distribution of the data, the Shapiro–Wilk test was applied. Non-parametric Mann–Whitney U tests were used in boxplots to compare levels ($\log_{10}$ MFI) of each antibody/antigen pair between study groups. Radar charts were used to compare median $\log_{10}$ MFI of all antibodies together between study groups by Mann–Whitney U test. Heatmaps with hierarchical clustering (Euclidean method) were used to evaluate patterns of responses at the individual level depending on clinical and demographic variables. Due to the unavailability of pre-pandemic saliva samples, we explored calculating seropositivity cutoffs by the mean plus 3 standard deviations (SD) of pandemic negative samples for serum/plasma and for saliva samples (**Figure S3**). All analyses were performed at 5% significance level with R software version 4.0.2. The ggplot2 package was used to perform boxplot graphs (26).

RESULTS

The basic demographic characteristics of SARS-CoV-2 infected (n=62, including 42 children) and non-infected (n=60) individuals in whom saliva and/or serum/plasma samples were analyzed, are shown in **Table 1**. The full database included in this study is available in **Table S1**.

Antibody Levels According to SARS-CoV-2 RT-PCR Status

We compared the levels ($\log_{10}$ MFI) of IgM, IgA and IgG antibodies to five SARS-CoV-2 antigens in saliva and serum/plasma samples from RT-PCR positive and negative individuals. IgG levels to all antigens in saliva were statistically significantly higher ($p<0.05$ for N CT and $p<0.001$ for the rest) in RT-PCR positive than negative individuals (**Figures 1A, B**). Levels of IgM and IgA to S (FL, S2 and RBD) but not N (FL, CT) antigens in saliva were statistically significantly higher in RT-PCR positive than negative individuals ($p<0.001$). In serum/plasma samples from the same individuals, all Ig isotypes were significantly higher in positive than negative individuals ($p<0.05$ for IgM to N and $p<0.001$ for the rest). The magnitude of antibody responses was substantially lower in saliva than serum/plasma samples despite being measured at a higher concentration (1/10

TABLE 1 | Characteristics of study participants from whom samples were analyzed.

	Negatives		Positives	
	Serum ^a (N = 48)	Saliva (N = 61)	Serum ^b (N = 58)	Saliva (N = 56)
Age				
Children	5 (10.4%)	10 (16.4%)	40 (69.0%)	40 (71.4%)
Adults	43 (89.6%)	51 (83.6%)	18 (31.0%)	16 (28.6%)
Sex				
Male	15 (31.2%)	19 (31.1%)	30 (51.7%)	28 (50.0%)
Female	33 (68.8%)	42 (68.9%)	28 (48.3%)	28 (50.0%)
Symptoms				
Yes	2 (4.2%)	2 (3.3%)	26 (44.8%)	26 (46.4%)
No	46 (95.8%)	59 (96.7%)	32 (55.2%)	30 (53.6%)
Sample collection (weeks)				
1	4 (20.0%)	9 (34.6%)	17 (32.1%)	19 (34.5%)
2	13 (65.0%)	13 (50.0%)	12 (22.6%)	12 (21.8%)
3	3 (15.0%)	4 (15.4%)	17 (32.1%)	17 (30.9%)
4	0 (0.0%)	0 (0.0%)	6 (11.3%)	6 (10.9%)
5	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.9%)	1 (1.8%)

Adult: age 15 years or older. There were 122 individuals participating in the study, 70 adults (25 males and 45 females) and 52 children (26 males and 26 females). There were 29 symptomatic and 93 asymptomatic individuals. Some individuals only contributed with serum or saliva samples.

^aSixteen serum samples were obtained from dried blood spots (DBS).

^bEight serum samples were obtained from DBS.

vs 1/500), and levels overlapped between positive and negative individuals to a higher degree in saliva than serum/plasma samples (Figure S3).

We evaluated whether RT-PCR positive individuals who were antibody negative had more recent infections. Stratified by time since diagnosis, levels of IgG against S in saliva and against RBD in serum/plasma were higher in samples collected >2 weeks after positive RT-PCR ($p<0.05$) (Figure 1C). In contrast, levels of IgM to S and S2 in saliva were lower in samples collected >2 weeks after positive RT-PCR ($p<0.05$).

Antibody Levels by Age and Sex According to SARS-CoV-2 RT-PCR Status

Among infected individuals, children had significantly higher serum/plasma levels of IgG to RBD and S ($p<0.01$), and significantly higher saliva levels of IgM to RBD and S than adults ($p<0.05$) (Figure 2). In contrast, infected adults had significantly higher levels of IgA to N FL in saliva than infected children ($p<0.05$). Infected male children also had higher saliva levels of IgG to N CT, N FL and RBD than female children ($p<0.05$) (Figure S4). Among SARS-CoV-2 RT-PCR negative individuals, children compared to adults had significantly higher serum/plasma levels of IgG to N FL ($p<0.05$).

Antibody Levels According to Presence/Absence of Symptoms

Among RT-PCR positive individuals, IgG levels to RBD and S were significantly higher in serum/plasma from asymptomatic than symptomatic subjects ($p<0.01$) (Figure 3A). In general, IgG and IgA but not IgM tended to be lower in saliva and serum/plasma from SARS-CoV-2 infected subjects who developed symptoms (Figure 3B). Stratifying by time since symptoms onset, serum IgA and IgG to RBD and IgG to S were higher 14 days after the onset of symptoms ($p<0.01$). In contrast, IgM to RBD, S and S2 in

saliva were lower 14 days after the onset of symptoms ($p<0.05$) (Figure 3C).

Correlation of Antibody Levels Between Saliva and Serum/Plasma Samples

The pattern of antibody responses in serum/plasma versus saliva samples varied depending on the Ig isotype and antigen (Figure 4A). Relative antibody levels in RT-PCR positive individuals were higher in serum/plasma than saliva samples, but in RT-PCR negatives, IgA levels were higher in saliva than serum/plasma samples. There was a statistically significant correlation between serum/plasma and saliva levels for all antibody isotypes against S antigens ($p<0.01$) and also for IgG and IgM to N FL ($p<0.05$) (Figure 4B). The strongest correlations were for IgG and IgA to S, followed by IgG to S2, and IgA and IgM to RBD.

Multimarker Analysis of Antibody Responses

Combining all the antibody isotype and antigen responses per sample (Figure 5A) and per individual (Figure 5B), and considering RT-PCR status, age and symptoms, a hierarchical clustering heatmap analysis revealed different patterns. Most samples from RT-PCR positive individuals clustered together (Figures 5A, B) and clusters by type of samples (saliva or serum/plasma) were also observed (Figure 5A). RT-PCR positive individuals tended to have a wider breadth of high-level antibody responses (right side) particularly intense anti-S and anti-RBD responses in serum/plasma samples, but clusters of high responses also mapped with RT-PCR negative individuals, including some N FL, N CT and S2 IgG and IgM serum/plasma (center Figure 5A) or IgA saliva (left Figure 5A) responders. Intensity of responses was generally lower for IgM particularly in saliva, which could be influenced by the inactivation. No clear

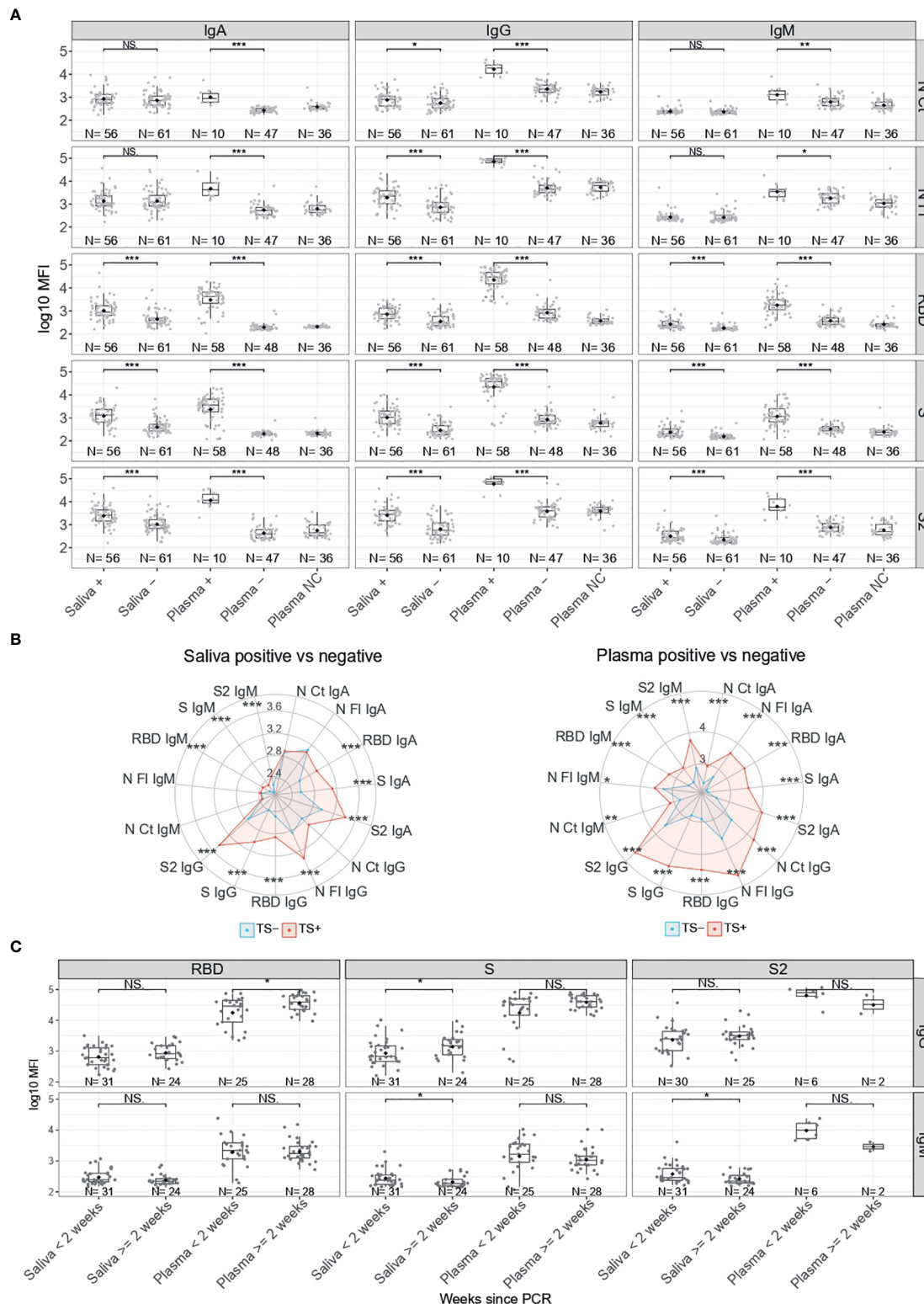


FIGURE 1 | Antibody levels according to SARS-CoV-2 RT-PCR status. **(A)** Boxplots showing $\log_{10}$ MFI antibody levels. Saliva samples were tested heat inactivated and at 1/10 dilution, and serum (from plasma samples or dry blood spots) at 1/500. **(B)** Radar charts representing the median of the $\log_{10}$ MFI antibodies in plasma and saliva. TS-: Negative Test Sample, represented in blue. TS+: Positive Test Sample, represented in red. **(C)** Boxplots showing $\log_{10}$ MFI antibody levels by time since positive RT-PCR. Median $\log_{10}$ MFI levels were compared by Mann-Whitney U test. Statistically significant raw p-values are highlighted with asterisks. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, NS, Not significant.

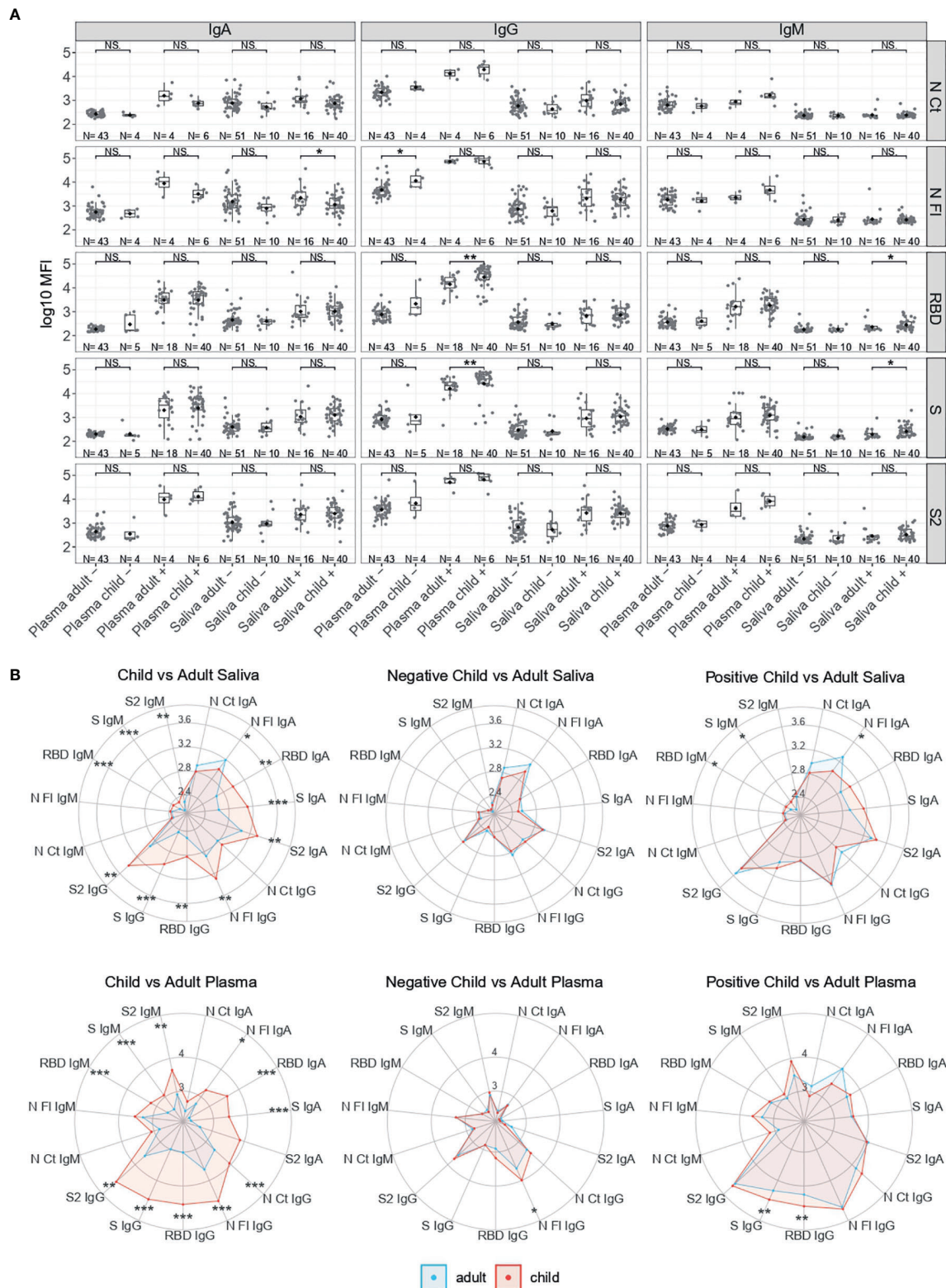


FIGURE 2 | Antibody levels according to SARS-CoV-2 RT-PCR status and by age. **(A)** Boxplots showing log₁₀MFI antibody levels of saliva samples tested heat inactivated and at 1/10 dilution, and serum (from plasma samples or dry blood spots) at 1/500. **(B)** Radar charts comparing the medians of antibody levels (in log₁₀MFI) between child and adult plasma and saliva samples. Adults are represented in blue and children in red. Median log₁₀MFI antibody levels were compared by Mann-Whitney U test. Statistically significant raw p-values are highlighted with asterisks. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, NS, not significant.

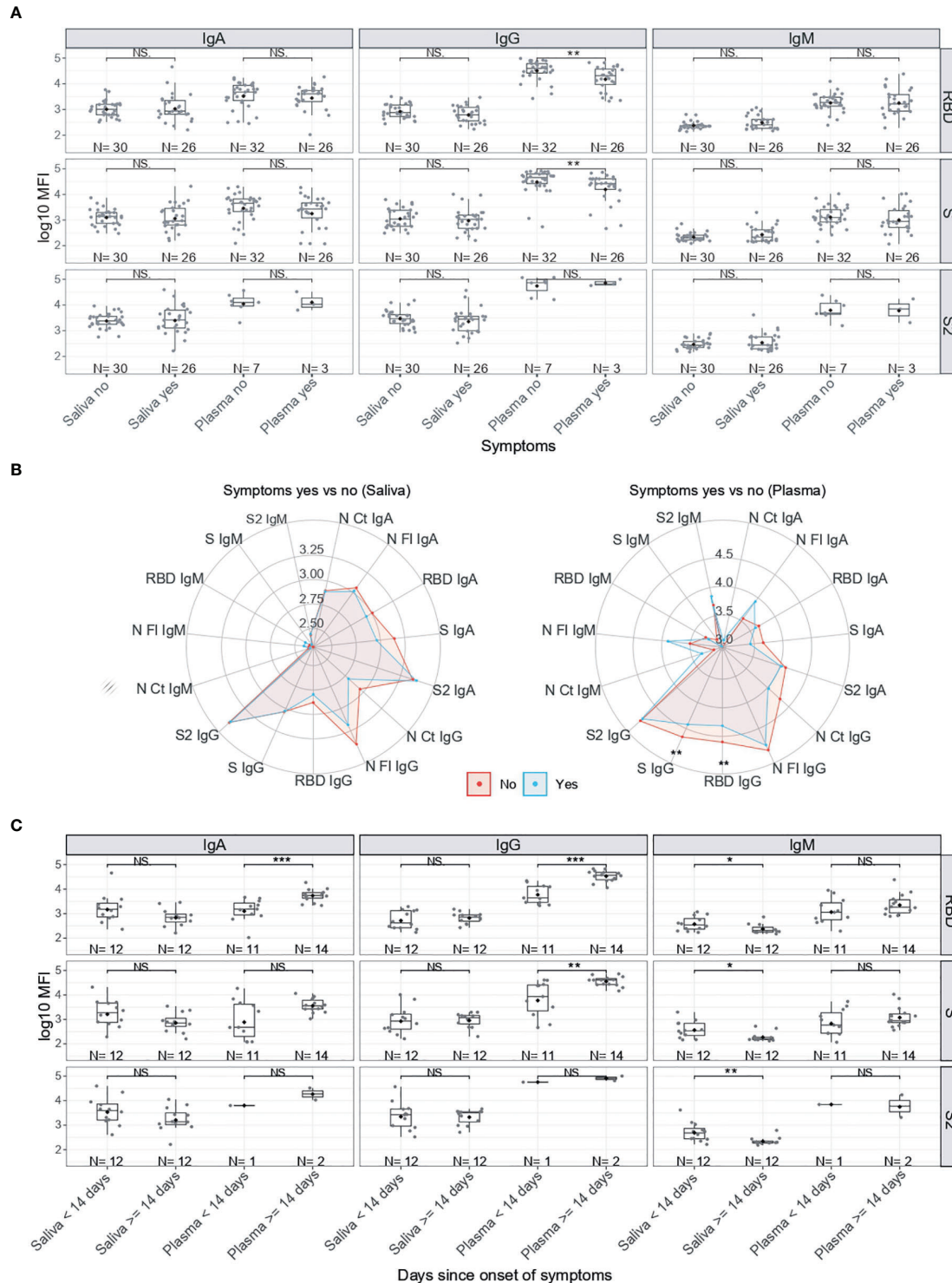


FIGURE 3 | Antibody levels by symptoms in SARS-CoV-2 positive individuals. **(A)** Boxplots showing $\log_{10}$ MFI antibody levels in saliva samples tested heat inactivated and at 1/10 dilution, and serum (from plasma samples or dry blood spots) at 1/500. **(B)** Radar charts comparing the medians of antibody levels (in $\log_{10}$ MFI) in serum/plasma and saliva between symptomatic (blue) and asymptomatic (red) individuals. **(C)** Boxplots showing $\log_{10}$ MFI antibody levels in saliva and plasma samples by Time since onset of symptoms. Median $\log_{10}$ MFI antibody levels were compared by Mann-Whitney U test. Statistically significant raw p-values are indicated with asterisks. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, NS: not significant.

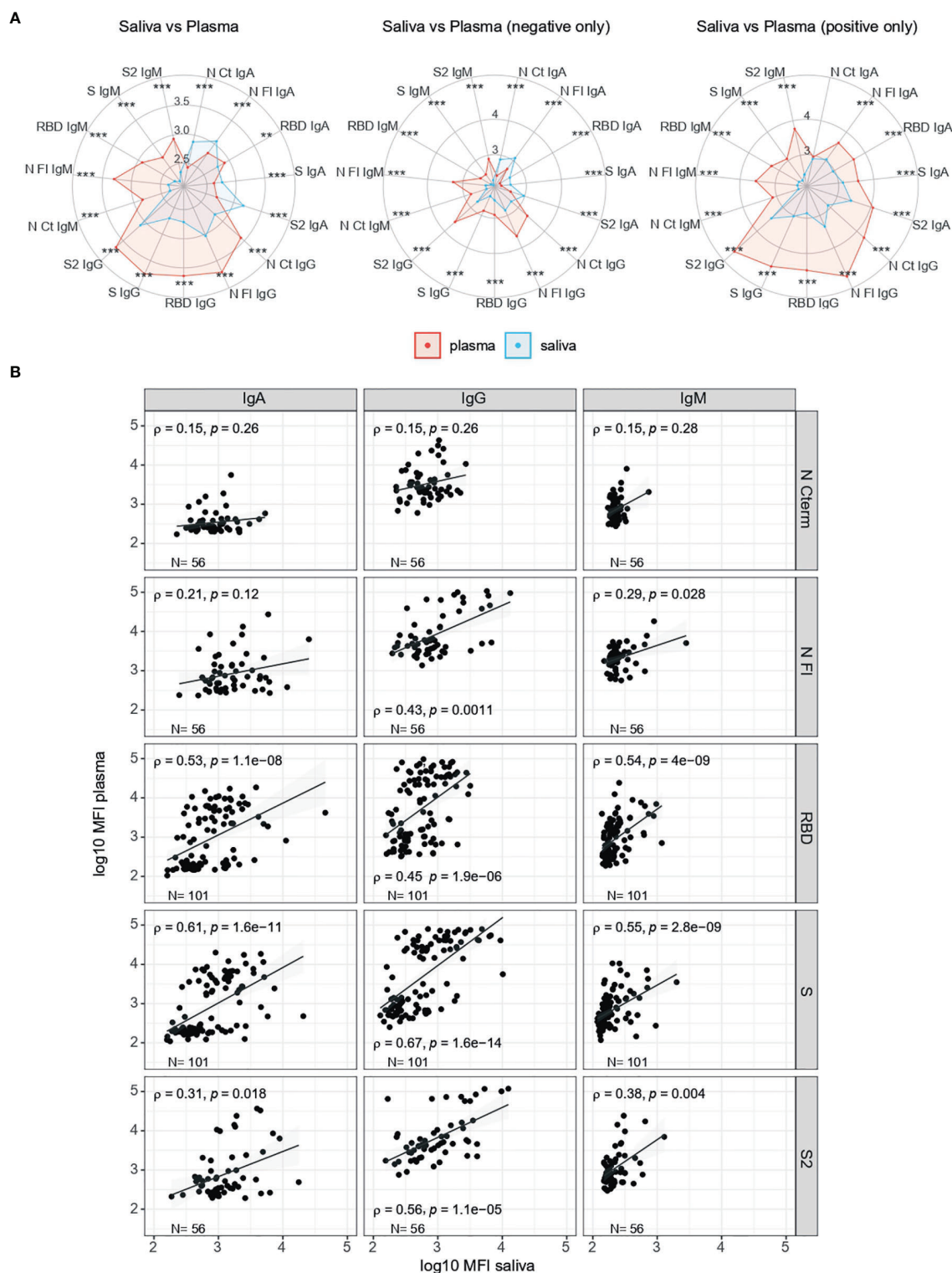


FIGURE 4 | Comparison of antibody levels in serum/plasma and saliva samples. **(A)** Radar charts comparing the medians of antibody levels (in log₁₀MFI) in serum/plasma (red) and saliva (blue), overall and by RT-PCR status. **(B)** Correlations of isotype-antigen pair levels between plasma and saliva samples. X axis shows the saliva levels at 1/10 dilution, inactivated; Y axis show serum/plasma levels at 1/500 dilution, not inactivated. Median log₁₀MFI antibody levels were compared by Mann-Whitney U test. Statistically significant raw p-values are highlighted with asterisks. ***p < 0.001, **p < 0.01.

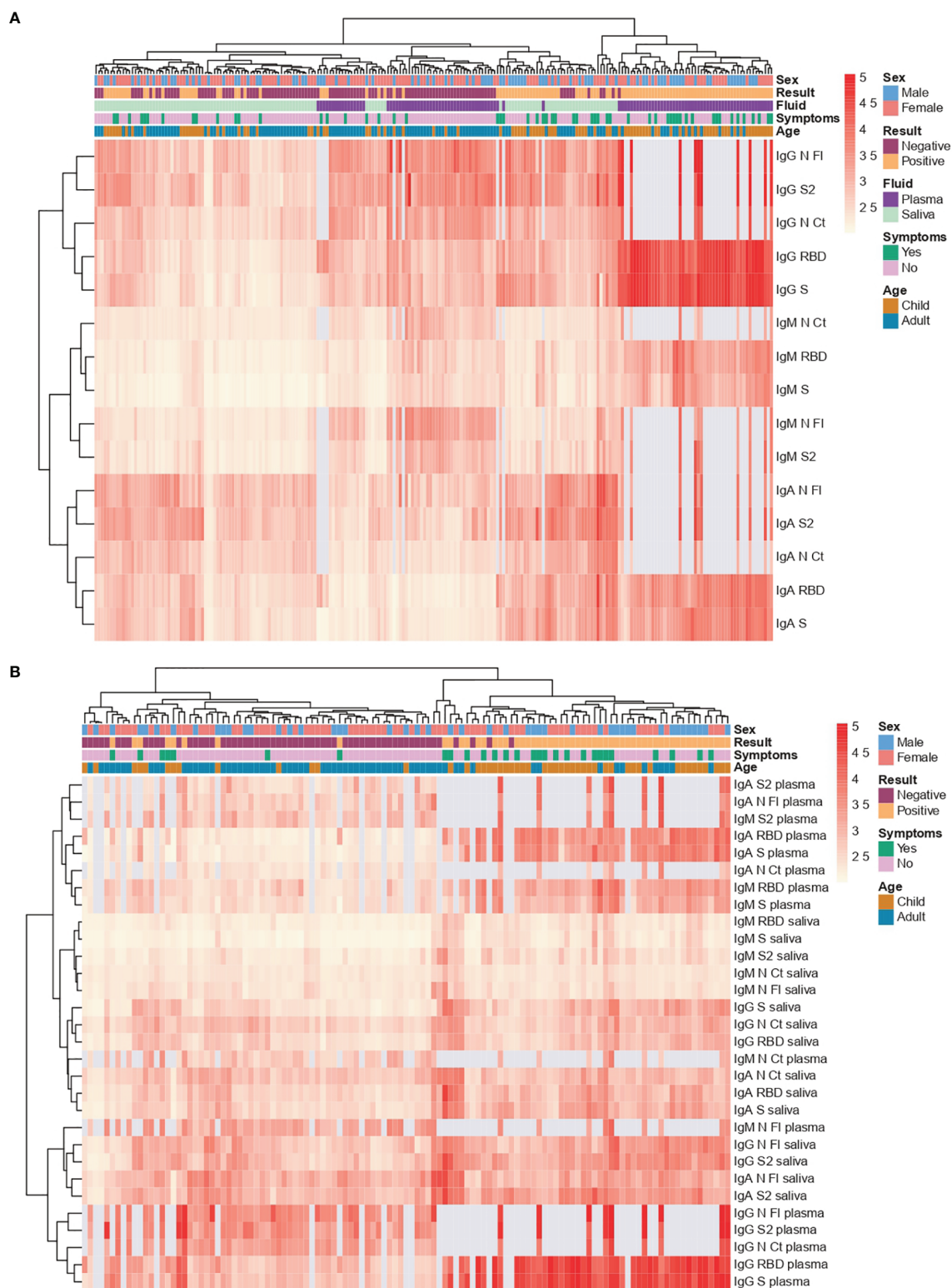


FIGURE 5 | Heatmap with hierarchical clustering. Saliva samples were tested heat inactivated and at 1/10 dilution, and serum (from plasma samples or dry blood spots) at 1/500. **(A)** Per sample (each column) **(B)** Per individual (each column). Light grey represents missing data, as more samples were tested for S and RBD than for the rest of antigens.

clustering was observed according to symptoms, while higher responses appeared to predominate more in children than adults.

DISCUSSION

We showed that significantly higher levels of saliva antibodies to SARS-CoV-2 could be measured from RT-PCR-confirmed cases than from RT-PCR-negative individuals with our high-throughput multiplex qSAT assays. Most antibody responses correlated significantly between saliva and serum/plasma samples but Spearman coefficients were moderate/moderate-high ($\rho < 0.7$) and depended on the Ig isotype and antigen pair. These variable correlations would indicate different dynamics of antibody responses in blood versus mucosal tissues (18, 27, 28). This suggests that responses that may not be detected in serum/plasma could be patent in saliva, and vice versa (29). This makes the saliva antibody assay relevant and complementary to serology assays. The fact that saliva antibody levels were much lower than blood levels but considering that saliva is a non-invasive and easy to use approach in the field compared to nasal swabs or blood pricking, represents a trade off between accuracy versus quicker and wider deployability that makes it valuable for pediatric studies.

We examined potential reasons for less discrimination between infected and non-infected subjects in saliva than in serum/plasma samples. On one hand, low antibody levels in some infected individuals could be due to non-responsiveness (30) or because a too recent exposure, as seen by higher IgGs two weeks after RT-PCR diagnosis. Low levels in saliva may not be explained by inappropriate sample collection as we used the Oracol devices that yield higher titres of total antibodies compared with other saliva/oral fluid sampling methods (31) and are well accepted across age groups (32). However, the quantity of antibody levels measured could have been affected by heat inactivation (18), therefore other methods based on Triton X-100 incubation would be preferred. On the other hand, medium-high Ig levels in saliva samples from RT-PCR negative and/or serum/plasma seronegative individuals could be indicative of a previous or current exposure to SARS-CoV-2 that was not detected by RT-PCR or serology (done by less sensitive RDT methods), i.e. false negatives. Indeed, being a study that recruited contacts of RT-PCR positive cases, it is not unreasonable that saliva serology could be more sensitive to detect infections with low or fast-resolving viral loads that might only induce a local mucosal response able to control viremia without the need to elicit a systemic response (33). In those cases, SARS-CoV-2-specific serum IgA titers may last shorter whereas serum IgG titers might remain negative or become positive later after symptom onset while mucosal IgA might be more patent. Thus, in addition to serum IgA and IgG, measurement of SARS-CoV-2-specific saliva IgA should be considered to better estimate the percentage of individuals who have experienced coronavirus infection (34). Alternatively, the detection of SARS-CoV-2 antibodies in saliva of RT-PCR negative people could relate to cross-reactivity to common cold HCoV that are more common

in children than in adults. Higher levels of pre-existing IgG to HCoV have been proposed as one potential explanation for the lower COVID-19 incidence in children (7, 8). We have seen that antibodies to N FL, followed by S2, are more present in pre-pandemic samples and more cross-reactive (25). These antibodies may also be more prevalent in saliva than in serum/plasma.

We investigated other factors that could be associated with the antibody responses in saliva. We observed different patterns to what is reported in cross-sectional population studies, where adults and symptomatic individuals tend to have higher antibody levels than children and asymptomatic ones, respectively. This could be related to the population under study, who are mostly children infected cases and their contacts. Higher levels of anti-S IgG among asymptomatic individuals could indicate protection against disease in infected individuals, and higher IgG and IgM levels in children could also be related to a stronger immunity. High antibody titers in saliva in vaccinated individuals have been related to lower transmission potential (35). The levels of antibodies in relation to days after positive RT-PCR or days since symptoms onset reflect the kinetics whereby saliva IgM are the first to appear and decay, while serum IgA and IgG increase later. Lower viral load has been associated with faster antibody kinetics (36). In relation to sex, the higher levels of saliva IgG to N and RBD in RT-PCR positive male children than female children could reflect sex-related differences in viral load (marker of exposure) or the ability to induce better immunity (marker of protection). This pattern is in contrast with serological studies in adults that did not find differences in males and females with mild or no symptoms (37), and could again reflect disparate dynamics of mucosal versus systemic responses, potentially affected by sex.

The significant role of mucosal immunity and, particularly, of secretory and circulating IgA antibodies in COVID-19, is becoming more apparent, and could be exploited for beneficial diagnostic, therapeutic, or prophylactic purposes (vaccines) (14). This supports the importance for screening antibodies in saliva in addition to serum. There is increasing evidence in favor of a key role for IgA in early virus neutralization (38): (i) early SARS-CoV-2-specific responses are typically dominated by the IgA isotype, (ii) peripheral expansion of IgA-plasmablasts with mucosal-homing shortly after the onset of symptoms and peak during the third week of the disease, and (iii) IgA may contribute to a much larger extent to virus neutralization as compared to IgG (28, 39).

A study limitation was that seropositivity thresholds could not be estimated with pre-pandemic saliva samples due to lack of access to them, and thus sensitivity and specificity could not be established for the saliva assays by standard methods. Using RT-PCR negative pandemic samples was somewhat useful for serum/plasma samples, but with saliva there was substantial overlap between antibody levels in infected and non-infected individuals. In addition, being pandemic samples, we cannot ascertain that they were not previously exposed at low levels and therefore this approach is not optimal. This constraint could be overcome in follow up studies by assessing seroconversion in

consecutive samples calculating the fold change increase in levels (e.g. ≥ 4) over a given study period (21, 28) and, in future, access to pre-pandemic samples in international biobanks will be sought. Finally, the sample size was limited to establish robust associations between factors affecting antibody levels, and there could be some imbalance between age and infection that might affect the results, therefore data should be interpreted with caution and need to be confirmed in larger studies. However, we analyzed the effect of age stratifying by infection status to take potential imbalances into account.

In conclusion, antibody levels in saliva measured with our high-throughput qSAT assays largely correlated with those in serum/plasma from individuals with confirmed RT-PCR diagnosis of SARS-CoV-2 infection, but the degree of correlation depended on the isotype and antigen. Higher antibody levels found in asymptomatic individuals and in children, particularly among males, could indicate protection against disease and stronger immunity. This non-invasive field deployable antibody screening could be useful to establish the percentage of people who have been exposed to SARS-CoV-2 in epidemiological surveys, and to assess the longitudinal maintenance of antibodies (40), particularly in children who were not initially prioritized in 2021 for COVID-19 vaccination. Furthermore, considering the significant correlation between saliva and serum/plasma of antibody levels to S, it could also be an attractive tool to monitor induction and maintenance of vaccine responses, including to variants of concern, as part of large-scale immunization campaigns (35, 41–43).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board and the Hospital Sant Joan de Déu Ethics Committee (Ref. PIC 153-20) and the Hospital Clínic ethics committee (Ref. CEIC-7455). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

REFERENCES

- Mehta NS, Mytton OT, Mullins EWS, Fowler TA, Falconer CL, Murphy OB, et al. SARS-Cov-2 (COVID-19): What Do We Know About Children? A Systematic Review. *Clin Infect Dis* (2020) 71(9):2469–79. doi: 10.1093/cid/ciaa556
- Smith BK, Janowski AB, Danis JE, Harvey IB, Zhao H, Dai Y-N, et al. Seroprevalence of SARS-Cov-2 Antibodies in Children and Adults in St. Louis, Missouri, USA. *mSphere* (2021) 6(1):e01027–20. doi: 10.1128/mSphere.01207-20
- Rytter MJH, Nygaard U, Mandic IN, Glenthøj JP, Schmidt LS, Cortes D, et al. Prevalence of SARS-Cov-2-Antibodies in Danish Children and Adults. *Pediatr Infect Dis J* (2021) 40(4):e157–9. doi: 10.1097/INF.0000000000003048

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD and SAJ wrote the first draft of the manuscript. RA, GM, and IJ contributed to the manuscript write up. NR, CC, and LI produced proteins for immunoassays. DB, LP, and AC managed samples. MV, AJ, RR, and SAJ performed antibody assays. RA, GM, and CD coordinated immunology and data analysis. RS and SAJ performed data analysis. CMA performed microbiology analyses. GP, MM, MH, MG-A, AG-M, EB-C, JC, MC, CF, VF, QB, BB, PM-M, SAJ, NB, SAR, MF, EG, JG-G, and IJ performed the clinical and epidemiological studies. All read approved the final version of the manuscript.

FUNDING

The project has been funded by Stavros Niarchos Foundation (SNF), Banco Santander and other private donors of KidsCorona, and Fundació Privada Daniel Bravo Andreu. RR had the support of the Health Department, Catalan Government (PERIS SLT017/20/000224). Development of SARS-CoV-2 reagents was partially supported by the NIAID Centers of Excellence for Influenza Research and Surveillance (CEIRS) contract HHSN272201400008C. ISGlobal receives support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through the “Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019–2023” Program (CEX2018-000806-S), and support from the Generalitat de Catalunya through the CERCA Program. CISM is supported by the Government of Mozambique and the Spanish Agency for International Development (AECID).

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the *Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació* for the sample and data procurement. Some serum/plasma samples were tested against RBD protein produced in lentivirus by the P. Santamaria lab, IDIBAPS, and Jordi Chi contributed for production of N proteins (through PID2019-110810RB-I00 grant to LI).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.751705/full#supplementary-material>

- Waterfield T, Watson C, Moore R, Ferris K, Tonry C, Watt A, et al. Seroprevalence of SARS-Cov-2 Antibodies in Children: A Prospective Multicentre Cohort Study. *Arch Dis Child* (2021) 106(7):680–6. doi: 10.1136/archdischild-2020-320558
- Zinszer K, McKinnon B, Bourque N, Pierce L, Saucier A, Otis A, et al. Seroprevalence of SARS-Cov-2 Antibodies Among Children in School and Day Care in Montreal, Canada. *JAMA* (2021) 4(11):e2135975. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.35975
- Zimmermann P, Curtis N. COVID-19 in Children, Pregnancy and Neonates: A Review of Epidemiologic and Clinical Features. *Pediatr Infect Dis J* (2020) 39(6):469–77. doi: 10.1097/INF.0000000000002700

7. Khan T, Rahman M, Al AF, SSY H, Ata M, Zhang Q, et al. Distinct Antibody Repertoires Against Endemic Human Coronaviruses in Children and Adults. *JCI Insight* (2021) 6(4):e144499. doi: 10.1172/jci.insight.144499
8. Nogrady B. How Kids' Immune Systems can Evade COVID [Internet]. *Nat.England* (2020) 588:382. doi: 10.1038/d41586-020-03496-7
9. Pavel AB, Wu J, Renert-Yuval Y, Del Duca E, Glickman JW, Miller RL, et al. SARS-Cov-2 Receptor ACE2 Protein Expression in Serum Is Significantly Associated With Age. *Allergy* (2020) 76(3):875–8. doi: 10.1111/all.14522. Denmark.
10. Posfay-Barbe KM, Wagner N, Gauthier M, Moussaoui D, Loevy N, Diana A, et al. COVID-19 in Children and the Dynamics of Infection in Families. *Pediatrics* (2020) 146(2):e20201576. doi: 10.1542/peds.2020-1576
11. Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, et al. Clinical and Immunological Assessment of Asymptomatic SARS-Cov-2 Infections. *Nat Med* (2020) 26(8):1200–4. doi: 10.1038/s41591-020-0965-6
12. Grossberg AN, Koza LA, Ledreux A, Prusmack C, Krishnamurthy HK, Jayaraman V, et al. A Multiplex Chemiluminescent Immunoassay for Serological Profiling of COVID-19-Positive Symptomatic and Asymptomatic Patients. *Nat Commun* (2021) 12(1):740. doi: 10.1038/s41467-021-21040-7
13. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui L-P, Johnston JC, et al. Diagnostic Accuracy of Serological Tests for Covid-19: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ* (2020) 370:m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516
14. Russell MW, Moldoveanu Z, Ogra PL, Mestecky J. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected But Critical Aspect of SARS-Cov-2 Infection. *Front Immunol* (2020) 11:3221. doi: 10.3389/fimmu.2020.611337
15. Pisanic N, Randad PR, Kruczyński K, Manabe YC, Thomas DL, Pekosz A, et al. COVID-19 Serology at Population Scale: SARS-Cov-2-Specific Antibody Responses in Saliva. *J Clin Microbiol* (2020) 59(1):e02204–20. doi: 10.1128/JCM.02204-20
16. Heinzel C, Pinilla YT, Elsner K, Friessinger E, Mordmüller B, Kremsner PG, et al. Non-Invasive Antibody Assessment in Saliva to Determine SARS-Cov-2 Exposure in Young Children. *Front Immunol* (2021) 12:4203. doi: 10.3389/fimmu.2021.753435
17. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal Profiles of Viral Load in Posterior Oropharyngeal Saliva Samples and Serum Antibody Responses During Infection by SARS-Cov-2: An Observational Cohort Study. *Lancet Infect Dis* (2020) 20(5):565–74. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1
18. Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, et al. Persistence of Serum and Saliva Antibody Responses to SARS-Cov-2 Spike Antigens in COVID-19 Patients. *Sci Immunol* (2020) 5(52):eabe5511. doi: 10.1126/sciimmunol.abe5511
19. Heaney CD, Pisanic N, Randad PR, Kruczyński K, Howard T, Zhu X, et al. Comparative Performance of Multiplex Salivary and Commercially Available Serologic Assays to Detect SARS-Cov-2 IgG and Neutralization Titers. *J Clin Virol* (2021) 145:104997. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104997
20. Jordan I, de Sevilla MF, Fumado V, Bassat Q, Bonet-Carne E, Fortuny C, et al. Transmission of SARS-Cov-2 Infection Among Children in Summer Schools Applying Stringent Control Measures in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis* (2021) 74(1):66–73. doi: 10.1093/cid/ciab227
21. Dobaño C, Alonso S, Fernández de Sevilla M, Vidal M, Jiménez A, Pons Tomas G, et al. Antibody Conversion Rates to SARS-Cov-2 in Saliva From Children Attending Summer Schools in Barcelona, Spain. *BMC Med* (2021) 19(1):309. doi: 10.1186/s12916-021-02184-1
22. Nishanian P, Aziz N, Chung J, Detels R, Fahey JL. Oral Fluids as an Alternative to Serum for Measurement of Markers of Immune Activation. *Clin Diagn Lab Immunol* (1998) 5(4):507–12. doi: 10.1128/CDLI.5.4.507-512.1998
23. McKie A, Vyse A, Maple C. Novel Methods for the Detection of Microbial Antibodies in Oral Fluid. *Lancet Infect Dis* (2002) 2(1):18–24. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00169-4
24. Dobaño C, Vidal M, Santano R, Jiménez A, Chi J, Barrios D, et al. Highly Sensitive and Specific Multiplex Antibody Assays to Quantify Immunoglobulins M, a and G Against SARS-Cov-2 Antigens. *J Clin Microbiol* (2020) 59(2):e01731–20. doi: 10.1128/JCM.01731-20
25. Dobaño C, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Chi J, Rodrigo Melero N, et al. Immunogenicity and Crossreactivity of Antibodies to the Nucleocapsid Protein of SARS-Cov-2: Utility and Limitations in Seroprevalence and Immunity Studies. *Transl Res* (2021), S1931–5244(21)00029-3. doi: 10.1016/j.trsl.2021.02.006
26. Wickham H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* [Internet]. New York: Springer-Verlag New York (2016). Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
27. Griffin SM, Chen IM, Fout GS, Wade TJ, Egorov AI. Development of a Multiplex Microsphere Immunoassay for the Quantitation of Salivary Antibody Responses to Selected Waterborne Pathogens. *J Immunol Methods* (2011) 364(1–2):83–93. doi: 10.1016/j.jim.2010.11.005
28. Wade TJ, Griffin SM, Egorov AI, Sams E, Hudgens E, Augustine S, et al. Application of a Multiplex Salivary Immunoassay to Detect Sporadic Incident Norovirus Infections. *Sci Rep* (2019) 9(1):19576. doi: 10.1038/s41598-019-56040-7
29. Faustini SE, Jossi SE, Perez-Toledo M, Shields A, Allen JD, Watanabe Y, et al. Detection of Antibodies to the SARS-Cov-2 Spike Glycoprotein in Both Serum and Saliva Enhances Detection of Infection. *MedRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.06.16.20133025
30. Oved K, Olmer L, Shemer-Avni Y, Wolf T, Supino-Rosin L, Prajgrod G, et al. Multi-Center Nationwide Comparison of Seven Serology Assays Reveals a SARS-Cov-2 Non-Responding Seronegative Subpopulation. *EClinicalMedicine-The Lancet* (2020), 29:100651. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100651
31. Vyse AJ, Cohen BJ, Ramsay ME. A Comparison of Oral Fluid Collection Devices for Use in the Surveillance of Virus Diseases in Children. *Public Health* (2001) 115(3):201–7. doi: 10.1016/S0033-3506(01)00444-9
32. Nokes DJ, Enquesselassie F, Vyse A, Nigatu W, Cutts FT, Brown DW. An Evaluation of Oral-Fluid Collection Devices for the Determination of Rubella Antibody Status in a Rural Ethiopian Community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1998) 92(6):679–85. doi: 10.1016/S0035-9203(98)90811-2
33. Tosif S, Neeland MR, Sutton P, Licciardi PV, Sarkar S, Selva KJ, et al. Immune Responses to SARS-Cov-2 in Three Children of Parents With Symptomatic COVID-19. *Nat Commun* (2020) 11(1):5703. doi: 10.1038/s41467-020-19545-8
34. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, et al. Systemic and Mucosal Antibody Responses Specific to SARS-Cov-2 During Mild Versus Severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* (2021) 147(2):545–57. doi: 10.1016/j.jaci.2020.10.040
35. Becker M, Dulovic A, Junker D, Ruetao N, Kaiser PD, Pinilla YT, et al. Immune Response to SARS-Cov-2 Variants of Concern in Vaccinated Individuals. *Nat Commun* (2021) 12(1):3109. doi: 10.1038/s41467-021-23473-6
36. Silva J, Lucas C, Sundaram M, Israelow B, Wong P, Klein J, et al. Saliva Viral Load Is a Dynamic Unifying Correlate of COVID-19 Severity and Mortality. *MedRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.01.04.21249236
37. Zeng F, Dai C, Cai P, Wang J, Xu L, Li J, et al. A Comparison Study of SARS-Cov-2 IgG Antibody Between Male and Female COVID-19 Patients: A Possible Reason Underlying Different Outcome Between Gender. *MedRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.03.26.20040709
38. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. Iga Dominates the Early Neutralizing Antibody Response to SARS-Cov-2. *Sci Transl Med* (2021) 13(577):eabd2223. doi: 10.1126/scitranslmed.abd2223
39. Zeng W, Ma H, Ding C, Yang Y, Sun Y, Huang X, et al. Characterization of SARS-Cov-2-Specific Antibodies in COVID-19 Patients Reveals Highly Potent Neutralizing Iga. *Nature* (2021) 6(1):35. doi: 10.1038/s41392-021-00478-7
40. Alkharaan H, Bayati S, Hellström C, Aleman S, Olsson A, Lindahl K, et al. Persisting Salivary IgG Against SARS-Cov-2 at 9 Months After Mild COVID-19: A Complementary Approach to Population Surveys. *J Infect Dis* (2021) 224(3):407–14. doi: 10.1093/infdis/jiab256
41. Pinilla YT, Heinzel C, Caminada L-F, Consolaro D, Esen M, Kremsner PG, et al. SARS-Cov-2 Antibodies Are Persisting in Saliva for More Than 15 Months After Infection and Become Strongly Boosted After Vaccination. *Front Immunol* (2021) 12:5146. doi: 10.3389/fimmu.2021.798859
42. Ketas TJ, Chaturbhuj D, Cruz-Portillo VM, Francomano E, Golden E, Chandrasekhar S, et al. Antibody Responses to SARS-Cov-2 Mrna Vaccines Are Detectable in Saliva. *BioRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.03.11.434841
43. Sano K, Bhavsar D, Singh G, Floda D, Srivastava K, Gleason C, et al. Efficient Mucosal Antibody Response to SARS-Cov-2 Vaccination Is Induced in Previously Infected Individuals. *MedRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.12.06.21267352

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Dobaño, Alonso, Vidal, Jiménez, Rubio, Santano, Barrios, Pons Tomas, Melé Casas, Hernández García, Girona-Alarcón, Puyol, Baro, Millat-Martínez, Ajanovic, Balanza, Arias, Rodrigo Melero, Carolis, García-Miquel, Bonet-Carné, Claverol, Cubells, Fortuny, Fumadó, Codina, Bassat, Muñoz-Almagro,

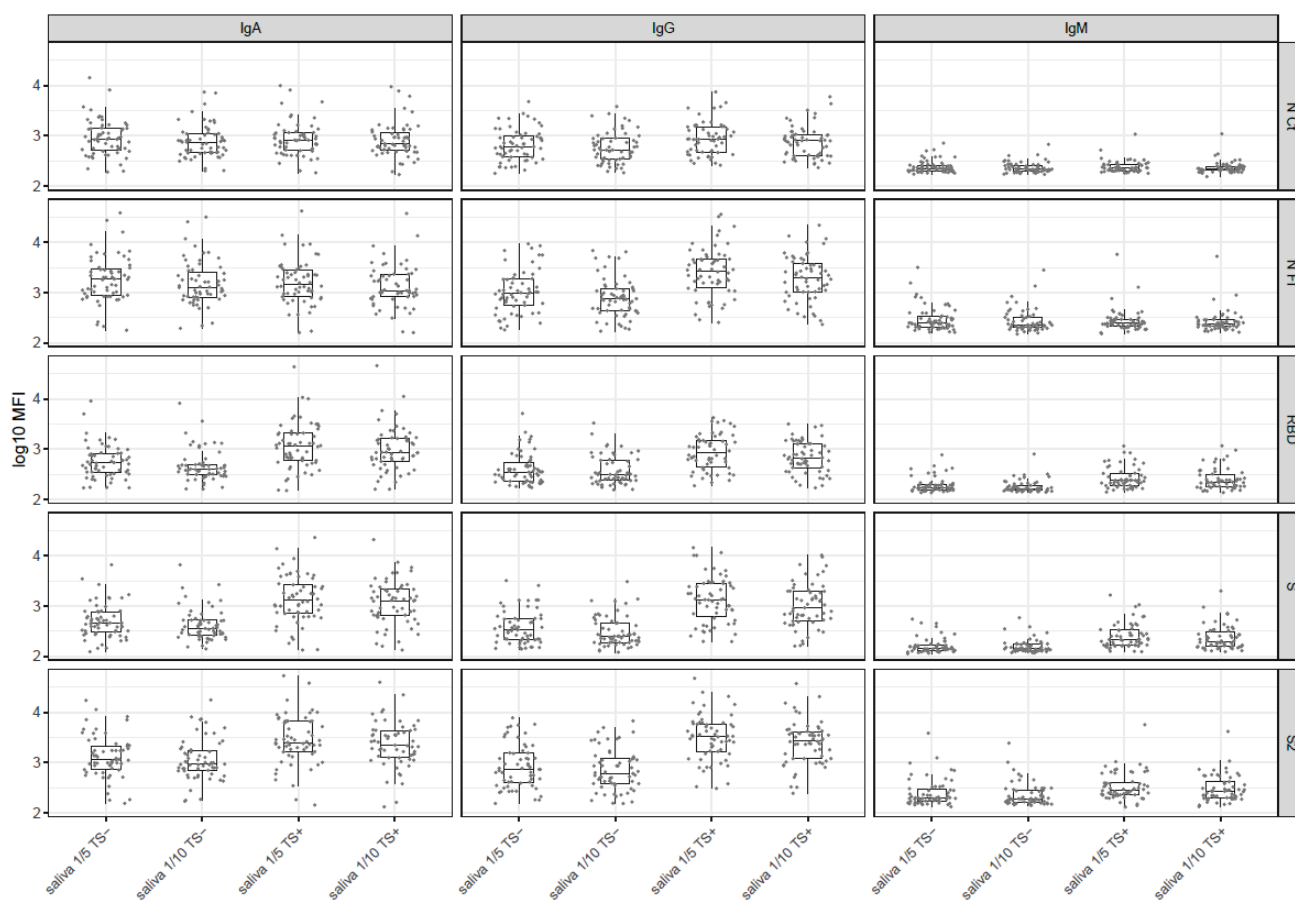
Fernández de Sevilla, Gratacós, Izquierdo, García-García, Aguilar, Jordan and Moncunill. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

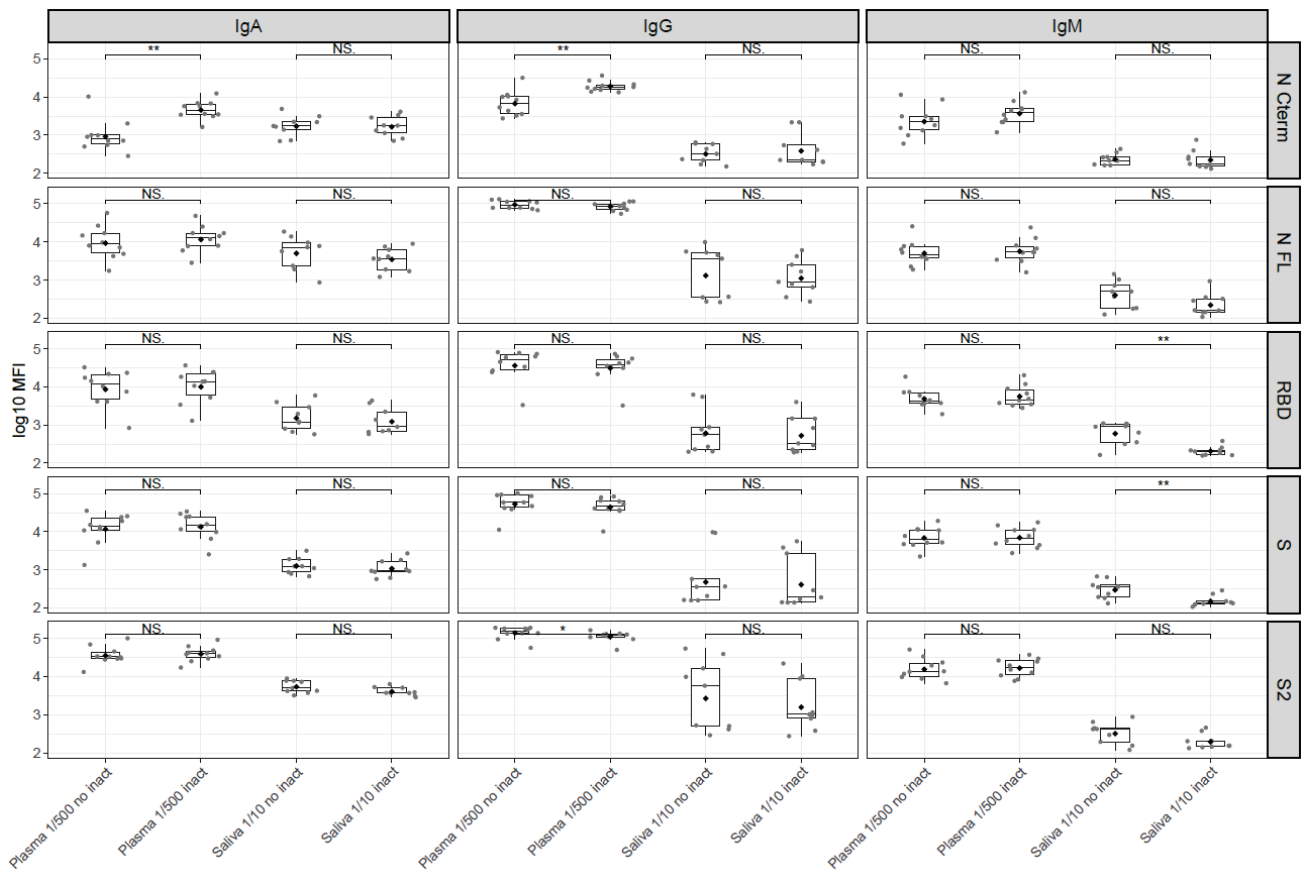
Multiplex Antibody Analysis of IgM, IgA and IgG to SARS-CoV-2 in Saliva and Serum from Infected Children and their Close Contacts

Carlota Dobaño, Selena Alonso, et al.

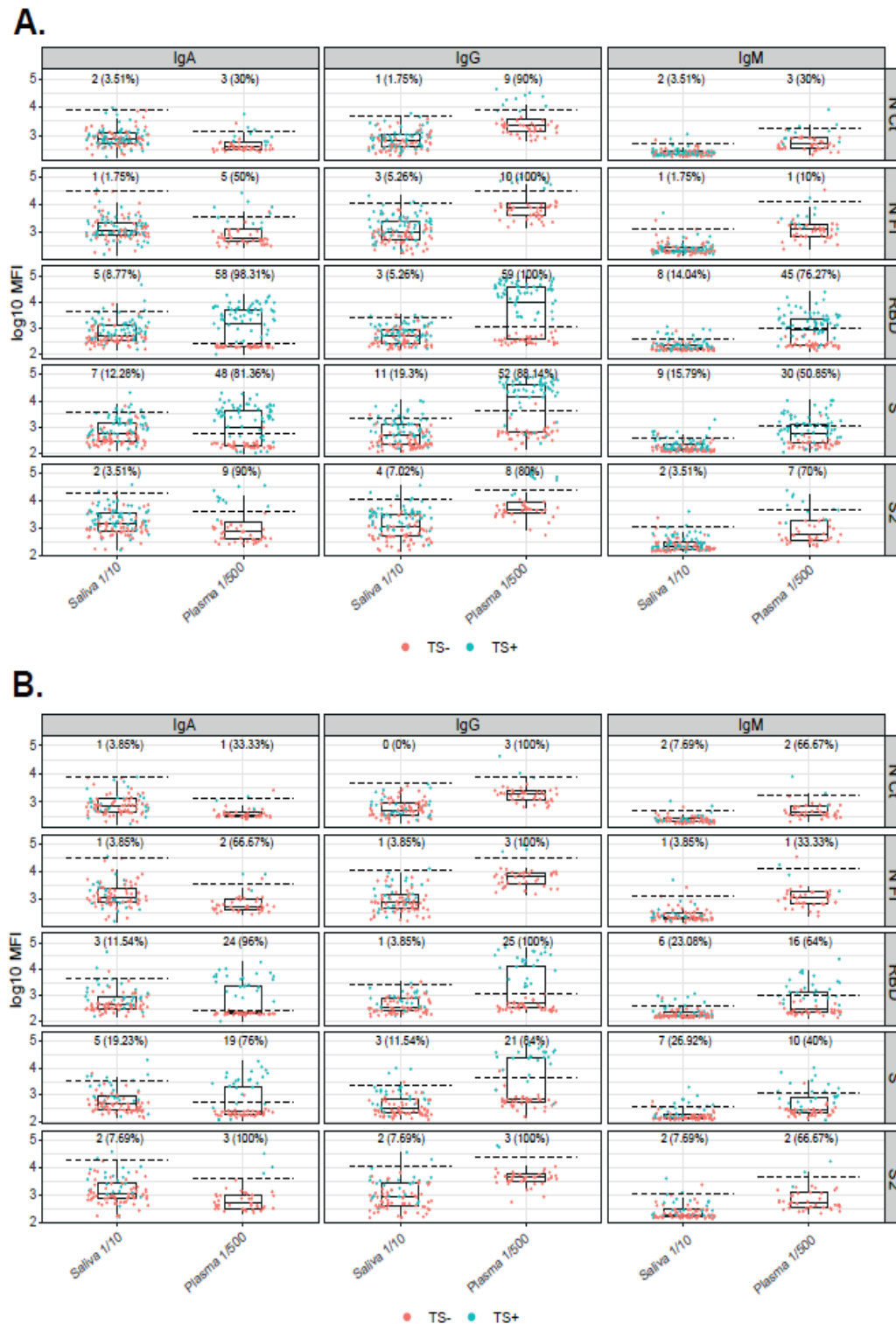
Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. Selection of dilution of saliva 1/5 vs. 1/10 in positive and negative test samples (TS).

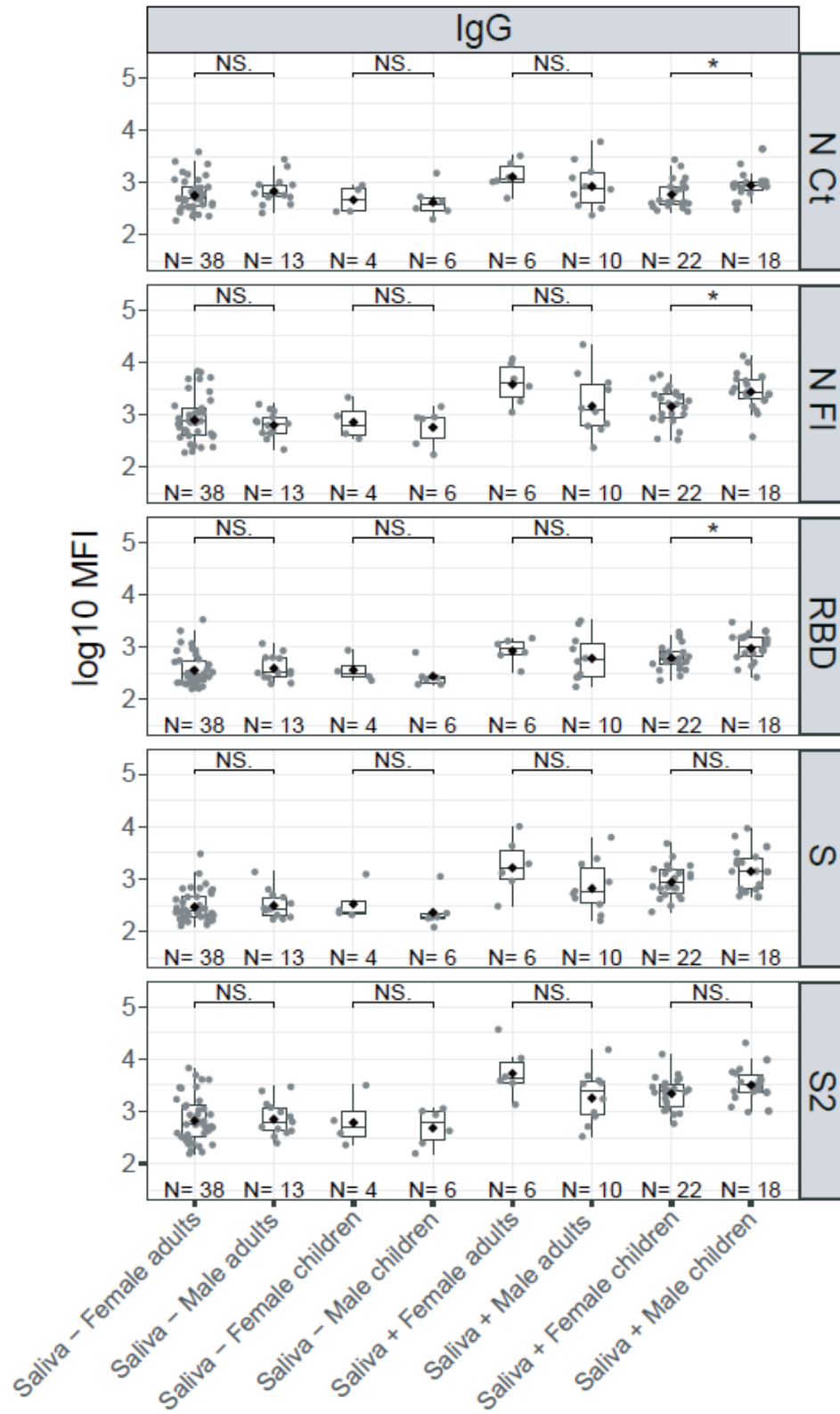


Supplementary Figure 2. Effect of heat inactivation in saliva and serum/plasma samples.



Supplementary Figure 3. Exploring seropositivity cutoffs calculated with negative pandemic samples. Cutoffs estimated with SARS-CoV-2 RT-PCR negative pandemic samples (TS-) discriminated up to 100% the positive individuals (TS+) depending on the antigen in serum/plasma but not saliva samples due to the overlap in antibody levels (A). Cutoffs estimated with the RT-PCR

negative pandemic samples in symptomatic patients discriminated positive individuals in more antigens **(B)**. Salivas were tested at 1/10 dilution and serum/plasmas at 1/500 dilution.



Supplementary Figure 4. Comparison of antibody levels in saliva samples stratified by sex and age.

5. DISCUSIÓN

Al inicio de la pandemia, solo se realizaban pruebas diagnósticas para la detección del SARS-CoV-2 a los pacientes con sospecha clínica de infección, o bien a los contactos estrechos de casos confirmados. Sin embargo, una vez se demostró que el SARS-CoV-2 estaba totalmente propagado en la sociedad, y tras observar que existían muchos más casos de personas asintomáticas de lo que inicialmente se pensaba, se consensuó aumentar el número de pruebas diagnósticas. Por ello, en los hospitales, se pasó de realizar alguna RT-PCR puntual (o antígeno cuando estuvo disponible), a realizar un cribado universal para SARS-CoV-2 en la mayoría de los pacientes visitados en urgencias que cumplieran criterios de sospecha de infección y en todo paciente que requiriera hospitalización. La identificación precoz de los niños infectados tuvo el objetivo de tratar de contener al máximo la propagación del virus, debido a la intensificación de las medidas de aislamiento adoptadas inmediatamente tras confirmar el diagnóstico.

Sin embargo, el hecho de conocer la presencia o ausencia de infección por SARS-CoV-2 en todos los pacientes pediátricos ingresados en un hospital, podía llevar a una sobreestimación de la gravedad de la enfermedad, ya que, por definición, se asume que una persona ingresada con infección por SARS-CoV-2 es porque presenta una COVID-19 grave. Por tanto, los datos publicados sobre tasas de hospitalización en pediatría llevaron a representar más la prevalencia de la infección que no tanto la gravedad de la enfermedad.

En esta línea, en el primer estudio que conforma esta tesis observamos que **hasta un tercio de los niños hospitalizados durante los dos primeros años de la pandemia fueron ingresados con infección por SARS-CoV-2 pero no a causa de ella**, es decir, ingresaban por otro motivo (por ejemplo, apendicitis) pero a la vez estaban cursando de forma asintomática o paucisintomática la infección por SARS-CoV-2, la cual se había detectado de forma incidental durante el cribado universal al ingreso. Además, vimos que, de entre los ingresados por COVID-19 (sin tener en cuenta los casos de síndrome inflamatorio multisistémico en niños [MIS- C]), solo el 10% se clasificó como COVID-19 grave, fundamentalmente por requerir mayor soporte respiratorio.

Otros autores han publicado resultados similares. Kushner *et al.*, realizaron un estudio en un hospital pediátrico de Estados Unidos, clasificando a todos los pacientes que ingresaron entre mayo de 2020 y febrero de 2021 en dos categorías según su motivo de ingreso: ingresados por COVID-19 o ingresados con COVID-19 (y, por tanto, que el verdadero motivo de

hospitalización fuera otro). Tras analizar 117 hospitalizaciones en dicho periodo, observaron que hasta 53 (45%) de los ingresos fueron por otro motivo, y no por la COVID-19. Por otro lado, observaron que de los 64 pacientes que sí que habían sido hospitalizados debido a la COVID-19, 3 fueron asintomáticos, 27 tuvieron síntomas leves-moderados, y 20 se caracterizaron como graves (los 14 restantes fueron diagnosticados con MIS- C) (103). En otro estudio similar, Webb *et al.* clasificaron los ingresos en tres categorías: incidental (es decir, ingresado por otro motivo, pero con una COVID-19 asintomática), potencialmente sintomático (ingresado por otro motivo, pero, en este caso, con síntomas leves de COVID-19, sin requerir soporte respiratorio) y significativamente sintomático (ingresado por COVID-19 con necesidad de soporte respiratorio). De 146 pacientes, el 40% representaron a los incidentales, el 47% a los potencialmente sintomáticos, y sólo el 14% representaron al grupo cuyo verdadero motivo de ingreso fue la COVID-19 (151).

Estos tres estudios reflejan, por un lado, el bajo impacto de la COVID-19 en la tasa de hospitalización en pediatría, y por otro, el bajo número de casos de COVID-19 grave que presentan los niños. Conocer estos datos ha sido fundamental a lo largo de la pandemia para tomar decisiones en materias de salud pública que afecten a la población pediátrica, como por ejemplo la reapertura de los colegios y guarderías o la vuelta la normalidad en el día a día de esta población.

A pesar de que la COVID-19 grave en pediatría es poco frecuente y los casos que requieren hospitalización son escasos, **es importante tratar de conocer qué factores llevan a algunos niños a desarrollar estas formas graves de la enfermedad y a ingresar.**

Por un lado, están los **factores dependientes del huésped**, es decir los inherentes al niño o niña como son la edad y las comorbilidades. En cuanto a la edad, se ha observado una distribución bimodal de la edad en relación con la necesidad de hospitalización, observando que ingresan más los niños menores de 1 año (sobre todo menores de 3 meses) y los adolescentes (152). De hecho, no sólo es que ingresen más, sino que además presentan formas más graves de la enfermedad, en cuanto a mayor necesidad de soporte respiratorio e ingreso en UCI (59,153). En cuanto a las comorbilidades, como se ha visto que los niños con antecedentes suelen ingresar más (100,152), algunos autores han planteado la duda de si el hecho de tener comorbilidades está asociado con una mayor gravedad de la COVID-19 o bien con un umbral de ingreso más bajo, es decir, que ante la presencia de un paciente con algún

antecedente de interés en el que exista una preocupación por posibles complicaciones derivadas de la infección se le ingrese con mayor facilidad en comparación con un paciente sin antecedentes (154). Lo que sí que se ha visto es la asociación existente entre la presencia de comorbilidades y la necesidad de mayor soporte respiratorio, ingreso en UCI y muerte (60,155,156). Los distintos estudios publicados han reportado que el 25-50% de los niños ingresados por COVID-19 presentan al menos una comorbilidad (60,157,158), cifras similares a las descritas en nuestro estudio. Además, esta cifra asciende hasta el 75-85% entre los ingresados en UCI y los que fallecen (155,156); de hecho, en nuestro estudio los dos pacientes que fallecieron tenían varias comorbilidades graves. Concretamente, las comorbilidades más observadas en los pacientes de nuestro estudio fueron el asma, las enfermedades neurológicas crónicas y la obesidad. Otros autores han descrito el mayor riesgo asociado de las enfermedades neurológicas crónicas (como la parálisis cerebral) y la obesidad a la COVID-19 (158,159), además de otras condiciones como la enfermedad cardiovascular, la diabetes, las enfermedades metabólicas, la anemia de células falciformes, la prematuridad o algunas inmunodeficiencias (59–61,157). Respecto al asma, hay datos contradictorios ya que algunos estudios la han asociado con una mayor tasa de hospitalización en niños con infección por SARS-CoV-2, pero a su vez se ha descrito que el asma como tal no empeora el pronóstico de la infección. En la misma línea, no se ha observado que el SARS-CoV-2 actúe como desencadenante de las exacerbaciones asmáticas (67,160). Por último, en relación a las comorbilidades, las recomendaciones actuales del Ministerio de Sanidad para la vacunación contra el SARS-CoV-2 incluyen vacunar a los niños con condiciones de riesgo como diabetes, obesidad, enfermedades crónicas cardiovasculares, neurológicas o respiratorias (incluyendo el asma), enfermedad renal o hepática crónicas, hemoglobinopatías, anemias o trastornos de la coagulación, asplenia e inmunodeficiencias primarias o secundarias, entre otras (161).

Por otro lado, están los **factores dependientes del virus**. Se ha visto que la gravedad de la COVID-19 puede estar relacionada con la variante del SARS-CoV-2. A pesar de que durante la ola en la que predominó la variante Ómicron (B.1.1.529) se vio un aumento claro en la tasa de hospitalización en pediatría, sobre todo en menores de 5 años (102), muchos estudios reportaron que precisamente dicha variante había demostrado ser menos virulenta que las anteriores (162,163). En un estudio publicado por Butt *et al.*, compararon 1735 casos de niños infectados por la variante Delta y 32635 casos de niños infectados por la variante Ómicron, y

vieron que la tasa de hospitalización, la necesidad de ingreso en UCI y la necesidad de ventilación mecánica fueron menores con la variante Ómicron que con la variante Delta (164). En nuestro estudio, a pesar de que no observamos diferencias significativas en cuanto a gravedad entre las diferentes variantes, probablemente debido al bajo número de pacientes reclutados durante el periodo de Ómicron, sí que vimos datos indirectos de una menor gravedad asociada a Ómicron en cuanto a una menor necesidad de soporte respiratorio, en comparación con otros periodos.

De entre los ingresos por COVID-19 observados en nuestro estudio, los más frecuentes fueron los ingresos por enfermedad pulmonar, y de entre las enfermedades pulmonares, la más frecuente fue la neumonía, como han descrito también otros autores (65–67). A pesar de ser la causa más frecuente de hospitalización, sus características clínicas no están tan bien definidas como la neumonía por SARS-CoV-2 que presentan los adultos (165).

La neumonía por SARS-CoV-2 en población pediátrica se ha descrito con mayor frecuencia en adolescentes y pacientes con comorbilidades (166–168). En el segundo estudio que conforma esta tesis describimos que la mayoría de los pacientes con neumonía eran mayores de 12 años y el 82% presentaba una o más comorbilidades. Es importante mencionar que el hospital donde se ha desarrollado nuestro estudio es un hospital de tercer nivel, y centro de referencia para enfermedades raras y complejas, aunque también es un hospital comunitario. Esto puede explicar en parte el alto porcentaje de pacientes con comorbilidades, o también puede indicar que estos pacientes tiendan a desarrollar una neumonía más grave que la población general.

La presentación clínica del paciente pediátrico con neumonía por SARS-CoV-2 suele ser con fiebre, tos y/o distrés respiratorio, los tres síntomas más frecuentes observados en nuestro estudio y también reportados por otros autores (167,169), con un tiempo de duración de los síntomas hasta el desarrollo de la neumonía de unos 5-7 días aproximadamente (51). En cuanto a la imagen radiológica, ésta difiere de la que presentan los adultos. Aunque en las radiografías de tórax se observan frecuentemente consolidaciones bilaterales, en un gran porcentaje de los casos los niños presentan una consolidación unilobar (sobre todo en lóbulos inferiores), una imagen similar a la de una neumonía bacteriana (70,170). También son

características las imágenes en vidrio deslustrado (171). Respecto a la radiología, al igual que en adultos se suele realizar con más frecuencia TAC pulmonares, en pediatría únicamente se realizan en pacientes concretos para descartar complicaciones como podría ser un tromboembolismo pulmonar, por lo que se considera suficiente el uso de la radiografía de tórax (172). Por otro lado, durante la pandemia ha cobrado mucha importancia el uso de la ecografía pulmonar, dada su gran utilidad como método de diagnóstico y seguimiento a pie de cama del paciente (sobre todo en pacientes ventilados cuyo traslado puede asociarse a complicaciones), y además sin aportar los efectos nocivos de la radiación (173).

Respecto a los resultados de los estudios de laboratorio que encontramos en los niños con neumonía por SARS-CoV-2, es habitual la anemia y la linfopenia y, aunque de forma no tan acusada como la respuesta inflamatoria observada en los adultos, la elevación de reactantes de fase aguda como la proteína C-reactiva, la procalcitonina o la LDH, u otras citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) (174,175). De hecho, la IL-6 es un parámetro que ha ganado protagonismo durante la pandemia dada la eficacia demostrada de los inhibidores de esta interleuquina en la COVID-19 y en algunos casos de MIS-C. En nuestro estudio observamos que la mayoría de los pacientes presentaban una IL-6 elevada, con una mediana de 32.1 pg/ml. En relación con este dato, Shafiek *et al.* llevaron a cabo un estudio sobre el perfil de citoquinas observado en los niños y adolescentes con neumonía por SARS-CoV-2, y determinaron que la elevación de IL-6 por encima de 31.7 pg/ml tenía un valor predictor de gravedad (176). De hecho, de los pacientes de nuestra cohorte que ingresaron en UCI, la mayoría mostró valores elevados de IL-6 en comparación con los que no ingresaron en UCI, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Como en otras neumonías virales, en la neumonía por SARS-CoV-2 es habitual la presencia de hipoxemia y la necesidad de oxigenoterapia. En nuestra cohorte, observamos que la mayoría de los pacientes necesitaron soporte respiratorio con oxigenoterapia de bajo flujo, sin embargo, un porcentaje no despreciable precisó ventilación no invasiva y ventilación mecánica convencional, algo distintivo a otras neumonías virales (177). Además del soporte respiratorio, en nuestro estudio llamó la atención que un 77.3% de los pacientes recibió antibioterapia ante la sospecha de una sobreinfección respiratoria. A pesar de que tanto los parámetros clínicos, como los analíticos y de laboratorio puedan ser superponibles a los de una neumonía bacteriana, creemos que este porcentaje de uso de antibioterapia puede estar

sobreestimado simplemente por el hecho de que nuestra cohorte estaba formada por pacientes hospitalizados y, por tanto, considerados más graves con respecto a los casos de neumonías por SARS-CoV-2 leves tratados de forma ambulatoria.

En cuanto a la gravedad, la tasa de ingreso en UCI de los niños con neumonía por SARS-CoV-2 ha sido variable en la literatura, con datos reportados de entre el 15 y el 55% según la serie (177,178). En nuestro estudio observamos que el 30% de los pacientes requirió ingreso en UCI; la mayoría tenían antecedentes de interés, sobre todo prematuridad (59). Por otro lado, en un estudio multicéntrico llevado a cabo en 47 UCI pediátricas en España durante la primera ola de la pandemia, se vio que un 27.6% de todos los pacientes ingresados en UCI presentaron un diagnóstico de neumonía grave con síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (99). Afortunadamente, el pronóstico en general de los niños con neumonía es favorable, con una baja tasa de complicaciones. En cuanto a la mortalidad de los pacientes, descrita en nuestro estudio del 4.5%, similar a otros estudios, se ha visto que está directamente asociada a la presencia de comorbilidades (177,179).

Por último, comentar los factores de riesgo que se han visto asociados al desarrollo de neumonía por SARS-CoV-2 en niños. Por un lado, los dependientes del virus: en nuestro estudio no vimos diferencias en cuanto a la incidencia de neumonía en función de la variante de SARS-CoV-2 predominante en cada momento. Aunque sí que vimos diferencias en cuanto a la edad de los pacientes, siendo menores los pacientes reportados en la ola de Ómicron (102), aunque hay que recordar que en ese momento todos los adolescentes y niños mayores de 5 años ya tenían acceso a la vacunación. Por otro lado, los dependientes del huésped: al igual que en nuestro estudio, otros autores han reportado que factores como la edad (lactantes y adolescentes) o las comorbilidades, los síntomas de fiebre, tos y disnea al ingreso, o la linfopenia, la hipoalbuminemia, la elevación de PCR, PCT, LDH, CK o dímero-D en las analíticas sanguíneas, se asocian a mayor gravedad de la neumonía (180). De hecho, en un estudio multicéntrico llevado a cabo en Tailandia, desarrollaron una escala predictiva del desarrollo de neumonía en niños con infección confirmada por SARS-CoV-2. Las variables que conformaron la escala fueron todas clínicas, incluyendo la edad inferior a 5 años, la presencia de comorbilidades (una o más de una), la fiebre por encima de 38.5°C y la presencia de disnea. Según el número de variables, clasificaron el riesgo del desarrollo de neumonía en bajo, medio o alto (181). Aplicando esta escala a nuestra cohorte, salvo en la variable relacionada con la

edad, observamos que nuestros pacientes cumplirían criterios para el resto de las variables (el 82% tenía al menos una comorbilidad, el 90.9% presentaron fiebre y el 75% disnea). Con estos datos podemos concluir que el diagnóstico de neumonía por SARS-CoV-2 en la población pediátrica es fundamentalmente clínico, aunque la presencia de ciertos factores de riesgo o ciertos hallazgos en la radiografía y en la analítica sanguínea nos pueden ayudar en el diagnóstico precoz de estos pacientes.

Aunque no sea una causa frecuente de hospitalización, **el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C) es la causa de mayor morbilidad y mortalidad relacionada con el SARS-CoV-2 en pediatría** (74,86). En el primer estudio que conforma esta tesis observamos que los pacientes con MIS-C representaban un 18% de todos los pacientes ingresados por la COVID-19, cifra similar a la reportada en otros estudios (103,151). Es cierto que en general todos los pacientes con MIS-C requieren ingreso (79), pero además, se ha reportado que hasta casi el 75% de estos pacientes acaban precisando ingreso en UCI (74). De hecho, en un estudio multicéntrico español que evaluó el impacto de la COVID-19 en las UCIs pediátricas, se reportó que hasta un 61.8% de los pacientes que ingresaban en UCI lo hacían debido al MIS-C, siendo el MIS-C el motivo de ingreso en UCI más frecuente (67). Es por ello importante conocer bien sus características, con tal de identificar precozmente a los pacientes afectados y así empezar un tratamiento eficaz lo antes posible para mejorar su pronóstico.

En general, el MIS-C afecta a niños y niñas de unos 8-10 años de mediana, mayoritariamente varones y en gran proporción de etnia hispana o negra (74,76,77). Suelen ser niños sanos, sin antecedentes de interés, aunque alguna serie ha descrito mayor prevalencia de MIS-C en pacientes con obesidad (74). En nuestra cohorte, descrita en el tercer estudio que conforma esta tesis, los pacientes tenían 10 años de mediana, el 69% eran varones y sólo un 7% tenía antecedentes de interés.

En cuanto a la clínica, se ha descrito que la fiebre persistente (de más de 3 días de evolución) sin un foco claro es el síntoma guía (78–80). De hecho, ante cualquier caso de fiebre de estas características, junto con la elevación de marcadores de inflamación sistémica (evidencia de disfunción orgánica), y una asociación temporal con el SARS-CoV-2, debería hacernos

sospechar que nos encontramos ante un caso de MIS-C (182). En nuestra cohorte, al igual que se ha descrito en otros múltiples estudios (74–77), todos los pacientes presentaron clínica de fiebre prolongada, y la gran mayoría presentaron síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, diarrea o vómitos, así como síntomas similares a los que se observan en la enfermedad de Kawasaki como son el exantema o el eritema conjuntival. También se ha descrito que hasta el 80% de los casos pueden presentar inestabilidad hemodinámica y disfunción miocárdica, similar a lo que se observa en el síndrome de shock tóxico, así como otras manifestaciones cardiovasculares, como pericarditis, valvulitis o anomalías coronarias (74). De hecho, en nuestra cohorte, hasta un 86% de los casos presentaron hipotensión, la mitad presentaron signos de disfunción miocárdica y hasta el 66% necesitó tratamiento inotrópico en contexto de shock. Otros signos y síntomas que pueden presentarse, aunque menos frecuentemente, son fallo renal agudo, trombosis o disnea en contexto de insuficiencia cardíaca o de tromboembolismo pulmonar. Sin embargo, síntomas respiratorios típicos de la COVID-19 no son habituales en los casos de MIS-C (183).

En cuanto a los hallazgos analíticos, es habitual encontrar elevación de marcadores de hiperinflamación, como PCR, PCT, ferritina, VSG o LDH, así como coagulopatía (78). Además, la mayoría de los pacientes presenta trombocitopenia, linfopenia o neutrofilia. Por otro lado, es habitual observar hipoalbuminemia, hiponatremia o elevación de enzimas cardíacas como péptido natriurético auricular (BNP) (183). En nuestra cohorte, además de estas alteraciones analíticas también destacó la elevación de citoquinas como la IL-6 u otros marcados inflamatorios como la ADM.

Por otro lado, además de las definiciones estandarizadas de este síndrome establecidas por las diferentes instituciones sanitarias (78–80), algunas sociedades han definido varios subtipos de MIS-C en función de los signos y síntomas predominantes (182): subtipo de fiebre e hiperinflamación indiferenciada, subtipo con hallazgos similares a los descritos en la enfermedad de Kawasaki, y subtipo de shock. Definir estos subtipos podría ayudar a dirigir el manejo de estos pacientes (184). Independientemente del subtipo de presentación, se ha visto que todos los pacientes pueden presentar un rápido deterioro clínico con desarrollo de disfunción miocárdica y requerir ingreso en UCI (182). De hecho, los pacientes de nuestra cohorte, que representan todos los casos de MIS-C que requirieron ingreso en la UCI de nuestro hospital entre 2020 y principios de 2022, bien podrían pertenecer a uno u otro

subtipo de presentación clínica. Por otro lado, algunos autores han visto que los pacientes que suelen requerir ingreso UCI suelen ser mayores y presentar más sintomatología gastrointestinal y cardiovascular en comparación con casos más leves de MIS-C. Por el contrario, estos últimos presentan más síntomas respiratorios y muco-cutáneos. En cuanto a los parámetros analíticos, los casos más graves de MIS-C suelen presentar mayor linfopenia y leucopenia, mayor recuento de plaquetas, así como mayor PCR y ferritina, aunque menor IL-6 (74).

La asociación descrita del MIS-C con el SARS-CoV-2 se debe demostrar con la presencia de una prueba positiva, ya sea RT-PCR, antígeno o serología, o en su defecto, mediante la demostración de un contacto previo con un paciente con COVID-19 confirmada (80). En el caso de nuestros pacientes, todos presentaron serologías IgG positivas, aunque 4 de ellos habían sido vacunados (no pudimos discernir si las IgG fueron debidas a la vacunación o a la infección pasada). Además, hasta un 23% aún tenían una RT-PCR positiva al ingreso.

Por último, respecto al pronóstico del MIS-C, en la literatura se ha reportado una tasa de mortalidad no despreciable del 1.9%, sobre todo debida a shock y/o disfunción miocárdica con necesidad de tratamiento inotrópico o soporte con oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) (74). En cuanto a la morbilidad, se ha descrito hasta en un 7.3% de los casos una disfunción cardíaca residual al alta o durante el seguimiento del paciente, así como algún caso aislado de sintomatología persistente neurológica (74,185). En nuestra cohorte, ningún paciente con MIS-C falleció, sin embargo, sí que se reportaron secuelas: un caso de COVID persistente con síntomas neurológicos (fatiga y mareo) durante 6 meses tras el ingreso, y dos casos de aneurismas coronarios. Por ello es importante realizar un seguimiento de estos pacientes al alta, tanto por parte del pediatra de atención primaria como por la de un cardiólogo y un reumatólogo pediátricos (183).

Como hemos visto, **todos los hallazgos clínicos y analíticos que definen el MIS-C no son específicos de este síndrome, sino que se pueden encontrar en otras entidades que cursan con inflamación** como la enfermedad de Kawasaki, el síndrome de shock tóxico estafilocócico o estreptocócico (SSTS), la COVID-19 o el síndrome de activación macrofágica (SAM). De hecho, el diagnóstico diferencial del MIS-C con estas entidades ha sido un auténtico reto durante la pandemia (82,84,186–188). Otra entidad cuyo fenotipo también es muy similar, y que acarrea una gran morbi-mortalidad en la infancia es la sepsis (189,190). De hecho, ya en

la definición del MIS-C se menciona el hecho de que se debe descartar la presencia de una sepsis para poder confirmar el diagnóstico de MIS-C (80), e incluso algunas guías recomiendan iniciar tratamiento empírico con antibioterapia en los casos de MIS-C con shock o disfunción orgánica hasta estar seguros de que no hay una infección bacteriana concomitante (184). Además, se debe tener en cuenta que a pesar de que durante la pandemia tanto la COVID-19 como el MIS-C han acaparado la atención de la mayoría de los estudios científicos, la sepsis ha seguido teniendo una incidencia mucho más elevada respecto a estas otras dos entidades en la población pediátrica (191). De ahí la **importancia de saber discernir entre sepsis y MIS-C**, cuyo manejo es tan diferente, y cuyas implicaciones diagnósticas y pronósticas son tan importantes en esta población.

Desde un punto de vista epidemiológico, podemos observar diferencias entre ambas entidades: en cuanto a la edad (la sepsis afecta mayoritariamente a niños menores de 5 años, sobre todo a neonatos (192), en cambio el MIS-C suele afectar a pacientes más mayores como hemos comentado (74,76,77)); y en cuanto a los antecedentes (al contrario que en los casos de MIS-C, hasta un 30-50% de los pacientes que presentan una sepsis tienen comorbilidades asociadas (189)). En nuestra cohorte, observamos dichas diferencias tanto en la edad como en los antecedentes de los pacientes. En cuanto a la evolución de la enfermedad, en nuestro estudio vimos reflejada la mayor gravedad asociada a la sepsis (189,190), ya que los pacientes presentaron mayor morbilidad (mayor estancia hospitalaria y estancia en UCI) y mayor mortalidad respecto a los pacientes con MIS-C. De hecho, los pacientes con sepsis también presentaron una mayor puntuación en el *Pediatric Risk of Mortality Score* (PRISM), una escala utilizada en UCI que evalúa el riesgo de mortalidad utilizando ítems como las constantes vitales, el estado neurológico del paciente y algunos parámetros de laboratorio.

Desde un punto de vista clínico, vemos similitudes en los criterios diagnósticos de ambas entidades (78–80,193). Son comunes la presencia de fiebre, la elevación de biomarcadores inflamatorios, la disfunción hemodinámica y otras disfunciones orgánicas. Aun así, podemos observar varias diferencias. Respecto a la fiebre, el síntoma guía del MIS-C como hemos visto, en ocasiones no está presente en los casos de sepsis, en los cuales incluso puede aparecer hipotermia (193). Además, la duración de la fiebre es muy distinta, siendo de varios días en los casos de MIS-C (al menos 3 días según la definición (80)), y de escasas horas en la mayoría

de los casos de sepsis. En nuestra cohorte observamos esta diferencia, que fue estadísticamente significativa, con una duración media de la fiebre de 20 horas para los casos de sepsis y de 96 horas para los casos de MIS-C. También vimos diferencias en otros signos y síntomas: en los pacientes con MIS-C fueron habituales síntomas gastrointestinales y signos muco-cutáneos parecidos a los de la enfermedad de Kawasaki (úlceras orales, eritema conjuntival, exantema...), sin embargo, en los pacientes con sepsis fue más común observar síntomas de disfunción neurológica como irritabilidad o alteración del nivel de consciencia. En cuanto a los biomarcadores inflamatorios, aunque la mayoría de las alteraciones en los reactantes de fase aguda se pueden encontrar tanto en los casos de sepsis como de MIS-C, algunos autores como Diaz *et al.* han intentado encontrar diferencias. Estos autores determinaron los niveles de IL-6 en los pacientes con MIS-C graves y en los pacientes con sepsis, viendo que en éstos últimos eran mucho mayores (194). En nuestra cohorte no pudimos comprobar dichas diferencias por falta de datos de la IL-6 en los pacientes con sepsis, pero sí que encontramos otras diferencias en cuanto a una elevación más marcada de fibrinógeno, VSG y PCR en los pacientes con MIS-C y, en cambio, una elevación mayor de la ferritina en los pacientes con sepsis. Además, debemos destacar dos parámetros que habitualmente están elevados en los casos de sepsis: la PCT y la MR-pro adrenomedulina (ADM). Es bien conocido el papel de la PCT como biomarcador de las infecciones bacterianas agudas. La ADM, sin embargo, es un biomarcador relativamente nuevo, que ha demostrado su utilidad en la detección de las infecciones invasivas (195,196). En nuestros pacientes observamos que la PCT se elevó más en pacientes con sepsis, sin embargo, la ADM fue mayor en los pacientes con MIS-C. Por último, respecto a la disfunción hemodinámica, también presente en ambas entidades, debemos destacar que tuvo un impacto distinto en nuestro estudio, ya que los pacientes con MIS-C tuvieron mayor disfunción a nivel ecocardiográfico (fracción de eyección del ventrículo izquierdo < 50%), así como mayor necesidad de tratamiento inotrópico. Sin embargo, no encontramos diferencias a nivel de la determinación de enzimas cardíacas. Como hemos comentado previamente, es fundamental determinar la función hemodinámica tanto en los casos de sepsis como en los casos de MIS-C (197), dada su implicación pronóstica.

Teniendo en cuenta todas estas similitudes y diferencias nos planteamos diseñar una **escala diagnóstica que pudiera distinguir entre ambas entidades**. La escala, denominada MISSEP

por la unión de MIS-c y SEPSis, se compuso de 5 variables clínicas, analíticas y terapéuticas, que previamente demostraron diferencias relevantes entre ambas entidades: horas de fiebre, cifra de plaquetas, dolor abdominal, eritema conjuntival y necesidad de drogas vasoactivas (medida con el Vasoactive Inotropic Score, VIS). Desde un punto de vista clínico, la escala determina que los pacientes con MIS-C, en comparación con aquellos con sepsis, presentan más horas de fiebre, una cifra menor de plaquetas, tienen más frecuentemente dolor abdominal y/o eritema conjuntival, y tienen mayor necesidad de tratamiento inotrópico. Otros autores han propuesto escalas diagnósticas para tratar de diferenciar el MIS-C de otras entidades a las que fenotípicamente se parece (82,186), sin embargo, no existía en la literatura ninguna escala que distinguiera MIS-C de sepsis. Creemos importante su utilidad dado que no solo ayuda en el diagnóstico, sino que secundariamente ayuda a dirigir el tratamiento específico y, de este modo, a mejorar el pronóstico de los pacientes. Aunque la escala se ha validado internamente, creemos necesaria una validación externa con un mayor número de pacientes, con tal de mejorar su aplicabilidad.

Durante las primeras olas de la pandemia, varios países impusieron restricciones estrictas a los niños y adolescentes, incluyendo el cierre de escuelas y la limitación de la práctica deportiva, ya que se les consideraba posibles super-diseminadores del SARS-CoV-2 (113–115). Esta afirmación se basaba, por un lado, en datos de otras infecciones como la gripe o el VRS acerca del importante papel que juegan los niños en la transmisión comunitaria de estas infecciones y, por otro lado, en la hipótesis de que los niños, debido a la poca clínica que presentaban, con un curso de la enfermedad mucho más leve que los adultos, podían actuar como reservorio de la infección y, por tanto, diseminarla a otras personas más vulnerables (113–115). Sin embargo, varios estudios desmintieron estos datos, primero demostrando que el hecho de tener una menor frecuencia y gravedad de los síntomas va asociado a tener una menor carga viral y, secundariamente, a ser menos transmisor (116,118,119). Segundo, con pruebas sólidas mediante estudios en escuelas (120–122), campamentos de verano (123), así como en domicilios con estudios intrafamiliares (117,124), observando en todos ellos que los niños no solían ser el caso índice de la infección. La mayoría de estos estudios se realizaron en menores de 12 años y principalmente en centros escolares y en domicilios, sin aportar muchos datos en relación a **la transmisión de la infección durante la práctica deportiva**, un

área en la que se debería hacer más énfasis dada su importante contribución a la salud general y al rendimiento escolar de los niños y adolescentes.

Las restricciones que se impusieron en algunos países limitando específicamente las actividades deportivas infanto-juveniles estaban basadas, además de en las razones antes expuestas, en la hipótesis de que durante la práctica deportiva se da una mayor emisión de aerosoles y gotas respiratorias conllevando, por tanto, a un mayor potencial de transmisión. Aunque esto se ha demostrado en adultos (126), en niños la evidencia es más limitada. La falta de datos claros acerca del mayor o menor riesgo de transmisión asociado al deporte, llevaron a discusión a las distintas organizaciones deportivas acerca de la vuelta a la normalidad en esta área para la temporada 2020-2021 (198,199).

De hecho, lo que sí se pudo demostrar en varios estudios fue el impacto deletéreo de limitar el deporte en los niños y adolescentes durante las primeras olas de la pandemia. Algunos ejemplos de ello fueron, a nivel de salud mental, observando una mayor ansiedad, síntomas depresivos, insomnio, e incluso mayor tentativa autolítica (128,200). Por otro lado, a nivel de salud física, el sedentarismo también tuvo consecuencias asociadas como síndrome metabólico, obesidad o diabetes, enfermedades prevenibles mediante la práctica deportiva (127).

Lo cierto es que, con el cuarto estudio que conforma esta tesis, pudimos demostrar un **bajo riesgo de transmisión asociado a las actividades deportivas** dado que, con la excepción del único brote observado que afectó a 24 participantes, durante la mayor parte de la temporada la incidencia de casos fue la misma que los casos esperados en la comunidad.

Para asegurar una menor transmisión en la práctica deportiva es fundamental la aplicación de medidas de prevención como el lavado de manos frecuente o el uso de mascarillas. Respecto a esto último, Watson *et al.* llevaron a cabo un estudio acerca de la asociación entre la incidencia de COVID-19 con el tipo de deporte y el uso de mascarilla en 991 institutos de Estados Unidos durante el otoño de 2020. Los autores concluyeron que el uso de mascarillas se asoció con una menor incidencia de COVID-19 en los deportes de interior, observando además que podía ser protector en los deportes al aire libre con contacto cercano prolongado entre los jugadores (201). Otro estudio, llevado a cabo en un club de fútbol juvenil compuesto por 1906 jugadores de entre 7 y 18 años, evaluó la utilidad de entrenar en grupos más

pequeños para así tratar de mantener una mayor distancia física entre los jugadores. Con estas medidas observaron que todos los casos de infección identificados durante el periodo de estudio provinieron de la comunidad, sin detectar ningún caso de transmisión entre jugadores o entre entrenadores y jugadores (202). Otras medidas preventivas que se han aplicado en la práctica deportiva y que han demostrado eficacia son la medición diaria de la temperatura y la monitorización de síntomas, entre otras (203).

Sin embargo, todas estas estrategias en ocasiones son insuficientes para aplicar en los niños y adolescentes, que mayoritariamente tienen síntomas leves o se mantienen asintomáticos. De ahí que además sea necesario realizar cribados de forma regular. De hecho, en atletas profesionales habitualmente se solicita tener una prueba diagnóstica (RT-PCR o antígeno) negativa previamente a poder competir (203). Sin embargo, esta condición no se aplica entre los más jóvenes. Por eso, nuestro estudio ofreció una buena oportunidad para estudiar la transmisión del SARS-CoV-2 a tiempo real en esta población, aplicando tanto medidas preventivas físicas (uso de mascarilla, higiene de manos frecuente, distancia social en la medida de lo posible y ventilación de los espacios cerrados) como un protocolo de prevención estricto basado en control diario de temperatura, monitorización regular de síntomas, así como cribado de la infección mediante RT-PCR y antígenos nasofaríngeos quincenales y RT-PCT en saliva semanales. La aplicación de protocolos de prevención que incluyan cribados regulares se ha visto de gran eficacia en otros estudios. De hecho, algunos autores como Lopez *et al.* demostraron que su aplicación redujo el número de infecciones observadas respecto a las esperadas (204). En nuestro caso, como hemos comentado, las infecciones observadas fueron las mismas que las esperadas en la comunidad, lo que sugiere igualmente que todas estas medidas fueron eficaces para poder mantener en activo durante la pandemia las actividades deportivas en niños y adolescentes.

Respecto a los factores que influyen en la transmisión del SARS-CoV-2 relacionados con el escenario, nos encontramos con las diferencias que se observan en la transmisión en ambientes abiertos o cerrados. Se ha observado que las interacciones en ambientes cerrados hacen aumentar hasta 20 veces el número de contagios respecto a ambientes al aire libre (205,206). Además, varios autores han señalado la importancia de la ventilación para la prevención de la infección en estos lugares, ya que la falta de esta puede conducir a brotes (207). Incluso se ha visto que cuando los brotes ocurren, raramente, en ambientes al aire

libre, suele ser porque son lugares masificados (207). Con respecto a esto, en nuestro estudio observamos como la tasa de ataque (o *Attack Rate*, *AR*), definida como el número de casos positivos respecto al número total de participantes susceptibles de ser infectados, fue hasta tres veces superior entre los participantes que vivían en La Masía (lugar de residencia ubicado en las instalaciones deportivas), con respecto a los participantes que vivían en sus propios domicilios y sólo acudían a entrenar o a trabajar a las instalaciones deportivas. En relación con esto, en el brote de casos observado durante el estudio, se vio que la mayoría de los participantes afectados vivían en La Masía, lo que sugiere el alto impacto derivado de la convivencia en un ambiente cerrado a pesar de la aplicación de medidas de prevención. De hecho, de los 5 primeros casos que dieron positivo en ese brote, y que podrían haber sido los casos primarios del mismo, sólo uno vivía en su propio domicilio y no en La Masía, lo que podría justificar que fuera este realmente el caso primario, aunque no lo pudiéramos demostrar. A este respecto, otros estudios han demostrado que la mayoría de los casos primarios en este tipo de escenarios son atribuibles a la comunidad (por contactos en su propio domicilio o en otros lugares), y no tanto a la transmisión durante la práctica deportiva (208). Por otro lado, en cuanto al tipo de deporte, Watson *et al.* observaron una menor incidencia de la infección en deportes al aire libre versus deportes en ambientes cerrados, y en deportes sin contacto versus deportes con contacto (201). Así también lo pudimos ver en nuestra cohorte, en la que observamos una tasa de ataque mayor en uno de los equipos de baloncesto, un deporte de contacto y realizado en un ambiente cerrado.

Por último, y para introducir el tema de las serologías como método de estudio de la transmisión del SARS-CoV-2, comentar que en nuestra cohorte observamos que un 22.5% de los participantes presentaron una seroconversión al final del estudio no detectada previamente (no habían presentado síntomas ni habían obtenido ningún resultado positivo en una prueba de RT-PCR o antígeno). Aunque parece que tengan un papel secundario, las pruebas de detección de anticuerpos han demostrado utilidad en los estudios de seroprevalencia (133), como en nuestro caso. Se ha visto que en las personas asintomáticas o que presentan síntomas leves, el título de anticuerpos suele ser menor, pueden no ser detectables o incluso serorevertir a las pocas semanas (139). Sin embargo, en nuestro estudio, en el que todos los casos positivos fueron asintomáticos o presentaron síntomas leves, hubo un nivel de seroconversión no despreciable, lo que nos ayudó a identificar a más personas

infectadas en comparación a si solo hubiéramos usado las pruebas de detección de infección aguda como la RT-PCR y el antígeno. Además, también es importante comentar acerca de la persistencia de anticuerpos a lo largo del tiempo y su relación con la capacidad de protección. En nuestro estudio observamos que 9 pacientes mantuvieron unas IgGs positivas a lo largo de todo el estudio, sin haber sido vacunados ni haberse reinfectado. Algunos estudios han demostrado una duración de los anticuerpos de hasta 6-8 meses (138,209), e incluso mayor en el caso de los adolescentes o personas que hayan presentado una COVID-19 grave (210,211). Aun así, debemos recordar que las pruebas serológicas no reflejan la riqueza y durabilidad real de la memoria inmunológica frente a SARS-CoV-2 ya que, por un lado, se ha demostrado que la respuesta inmune humoral puede mantenerse incluso aunque no se detecten los anticuerpos (140) y, por otro lado, se ha visto que la respuesta inmune celular juega también un papel protector fundamental (138).

Varios estudios han evaluado **el uso de la saliva como muestra para el diagnóstico del SARS-CoV-2** ya que puede ofrecer varias ventajas: su técnica de recolección es fácil y no invasiva, es más aceptable para repetir pruebas de forma periódica y puede ser realizada tanto por profesionales no sanitarios como por las propias personas debidamente instruidas (143). Además, por su facilidad de obtención de forma no invasiva, es de gran utilidad para su aplicación en la población pediátrica (133).

En estudios en adultos, el uso de la RT-PCR en saliva para la detección del SARS-CoV-2 ha demostrado una precisión diagnóstica similar en comparación con las muestras nasofaríngeas (212), lo que apoya su uso a gran escala debido a las ventajas que ofrece. Por otro lado, la saliva también se ha utilizado como muestra para estudios de seroprevalencia, mediante la detección de anticuerpos (145,147), demostrando también una buena correlación en comparación con las serologías realizadas en sangre (213). Sin embargo, los datos sobre el uso de la saliva para detectar y estudiar la transmisión del SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos son variables. Aunque algunos autores hablan de un bajo rendimiento de las muestras de saliva, con sensibilidades del 53 al 72% (214), otros sin embargo han observado resultados prometedores en niños (146,215,216). Yee *et al.* realizaron un estudio que comparó muestras de saliva con muestras de nasofaringe para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en 300 adultos y niños. Demostraron una concordancia entre los resultados

de las muestras superior al 90% e, incluso, observaron hasta 10 casos que obtuvieron un resultado positivo en saliva y negativo en muestra nasofaríngea, lo que destaca el importante papel que puede jugar el uso de saliva de forma concomitante a las muestras nasofaríngeas (215). En cuanto a las serologías, Heinzl *et al.* realizaron un estudio para determinar los anticuerpos frente a SARS-CoV-2 en 837 niños de 1 y 10 años, demostrando una sensibilidad y especificidad de la técnica en saliva del 87% y 100%, respectivamente (146). Por otro lado, Keuning *et al.* evaluaron la concordancia de las serologías en saliva y en sangre de 517 niños, llegando a la conclusión acerca de la heterogeneidad de la respuesta inmune mediada por los anticuerpos circulantes en comparación con los anticuerpos de mucosas, y enfatizando el valor adicional de la detección de anticuerpos en saliva en los estudios de seroprevalencia (216). En la misma línea, en el quinto estudio que conforma esta tesis, se demostró el potencial de las técnicas de detección de serologías en saliva para estudios epidemiológicos, observando por un lado la **alta capacidad de detección de anticuerpos tanto en adultos como en niños infectados, así como mostrando una buena correlación entre las serologías en saliva y en sangre.**

En nuestra cohorte observamos que, al igual que las serologías en sangre, los títulos de anticuerpos en saliva fueron significativamente mayores en las personas que tuvieron una RT-PCR positiva durante el periodo de estudio respecto a aquellas personas con RT-PCR negativa. Sin embargo, también vimos que la magnitud de la respuesta de anticuerpos fue menor en las muestras de saliva respecto a las de sangre. Esto puede indicar que existen diferentes dinámicas de respuesta inmune mediada por anticuerpos a nivel de inmunidad de mucosas e inmunidad sistémica (213,217,218), lo que a su vez justifica que a veces podamos detectar anticuerpos en saliva y no en sangre, y viceversa (219). Respecto a esto último, ante casos de personas con RT-PCR negativa a las que se les detectan anticuerpos en saliva, pero no en sangre, por un lado, podemos pensar que se trata de casos falsos negativos, es decir, que realmente son casos con una exposición previa o actual al SARS-CoV-2 que no ha sido detectada por RT-PCR o serologías por haberse realizado por métodos menos sensibles, por ejemplo. Sin embargo, también se puede justificar pensando en que en infecciones leves o que se resuelven rápido, se induce una respuesta inmune de barrera (o de mucosas) lo suficientemente potente como para controlar la infección sin necesidad de que se llegue a desarrollar una respuesta sistémica y detectable en sangre. Este hecho fue demostrado por

Cervia *et al.*, quienes evaluaron las posibles diferencias en la respuesta inmune sistémica y de mucosas comparando casos de COVID-19 leves y graves (220). Observaron que en algunos casos leves de la enfermedad no se detectaban anticuerpos en sangre o se detectaban de forma transitoria, pero sí se detectaban títulos elevados de IgA contra SARS-CoV-2 en lágrimas, saliva y secreción nasal. Y, por el contrario, en casos de COVID-19 grave se detectaban títulos muy altos de anticuerpos IgA e IgG en sangre. Es decir, se podría extrapolar que la gravedad de la enfermedad es directamente proporcional a la inducción de una respuesta sistémica e inversamente proporcional a una respuesta eficaz de mucosas. Además, con estos datos llegaron a la conclusión de que la medición de anticuerpos IgA e IgG en sangre de pacientes asintomáticos podría infraestimar la prevalencia de la enfermedad, lo que a su vez da importancia a la detección de anticuerpos en fluidos de mucosas como la saliva en los estudios de prevalencia. Por otro lado, otra teoría que podría explicar el hecho de detectar anticuerpos en saliva de personas con RT-PCR negativa es por reactividad cruzada con otros coronavirus endémicos (aquellos que son causa de resfriados, muy frecuentes en los niños). De hecho, una de las razones propuestas acerca de la menor incidencia y severidad de la COVID-19 en la población pediátrica es debido a la posible protección, por reactividad cruzada, que les confieren los títulos de anticuerpos frente a los coronavirus endémicos (221,222). En relación con esto, en otro estudio de nuestro grupo de investigación, observamos que algunos anticuerpos dirigidos a antígenos de la nucleocápside o la espícula viral estaban más presentes en las muestras pre-pandemia usadas como control que en las propias muestras recogidas para el estudio (223).

En general, los adultos y las personas que cursan la COVID-19 con síntomas suelen presentar mayores títulos de anticuerpos (139,224–226). A diferencia de lo reportado en otras investigaciones (225,226), en nuestro estudio observamos que los niños tuvieron mayores títulos de IgG en sangre (tanto en casos de RT-PCR positiva como negativa) e IgM en saliva respecto a los adultos. Este dato puede indicar que los niños tengan una inmunidad más potente que les proteja de infectarse o de presentar formas graves de la enfermedad. Por otro lado, también al contrario de lo descrito en otros estudios (139,224), en nuestra cohorte observamos que los participantes que cursaron la enfermedad con síntomas tuvieron menores títulos de IgG e IgA tanto en saliva como en sangre, en comparación con los asintomáticos. El hecho de que las personas asintomáticas tengan mayores títulos de

anticuerpos podría explicar que éstos les confieran protección frente a la progresión de la enfermedad cuando se infectan. Por último, en cuanto a diferencias según el género, en nuestro estudio observamos que los niños varones tuvieron mayores títulos de anticuerpos en saliva que las niñas. Otros autores también han descrito diferencias en los títulos de IgG en sangre entre hombres y mujeres (227), lo que viene a decir que las diferencias en el género se podrían relacionar con diferencias en la carga viral o en la propia inducción de la respuesta inmune tanto sistémica como de mucosas.

Para finalizar, mencionar que algunos autores hablan de la evidencia del papel de la IgA, la principal inmunoglobulina que se encuentra en la saliva, en la neutralización del SARS-CoV-2 (144,228,229). Por ello y por todos los datos previamente expuestos, se debe recalcar la importancia del estudio serológico del SARS-CoV-2 en saliva, de forma concomitante al estudio serológico en sangre, tanto para estudios de seroprevalencia como para estudios de transmisión como el expuesto en esta tesis acerca de la transmisión del SARS-CoV-2 en ambientes deportivos. Además, destacar que realizar estudios serológicos en saliva puede también ser útil para evaluar la duración de los anticuerpos generados por la infección natural (230), sobre todo en niños menores de 5 años que aún no tienen acceso a la vacunación en España, o para monitorizar la respuesta y el mantenimiento de la protección de las vacunas en el resto de la población (231–233).

LIMITACIONES

Los estudios que conforman esta tesis tienen varias limitaciones.

En primer lugar, los tres primeros estudios expuestos son estudios unicéntricos, con un tamaño muestral no despreciable pero pequeño, y en los que la recogida de datos fue retrospectiva. Esto último pudo contribuir a la falta de algunos datos clínico-analíticos de los pacientes, por ser desconocidos o no haber sido registrados en su historia clínica. Además, a lo largo del periodo de estudio los protocolos diagnóstico-terapéuticos de la COVID-19 fueron cambiando, adaptándose a la nueva evidencia científica que se iba publicando, lo que podría haber contribuido a la heterogeneidad de algunos datos.

En el caso concreto del estudio de neumonías por SARS-CoV-2, puede que se haya subestimado su incidencia total, dado que solo se incluyeron las neumonías de los pacientes hospitalizados y no las de los pacientes de manejo ambulatorio.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que el hospital donde se han desarrollado los estudios es un centro de referencia para muchas enfermedades pediátricas, lo que puede haber llevado a sobreestimar la prevalencia de algunas comorbilidades de los pacientes.

Por último, respecto al cuarto y quinto estudios, su carácter prospectivo pudo contribuir a tener también una falta de datos de los participantes que se perdieron en el seguimiento. Además, al ser estudios de transmisión es posible que las pruebas de screening/diagnóstico empleadas no identificaran a todos los casos positivos asintomáticos.

FORTALEZAS

Los estudios que conforman esta tesis ofrecen datos sobre el verdadero impacto de la COVID-19 en la tasa de hospitalización infantil, así como sobre los factores de riesgo asociados a ingreso en los pacientes pediátricos. Además, describen detalladamente los cuadros clínicos más graves que afectan a los niños: la neumonía por SARS-CoV-2 y el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C), ayudando a diferenciar este último de los cuadros de sepsis. El hecho de contribuir a conocer mejor aquellos casos de COVID-19 graves y que requieren atención hospitalaria es clave para diagnosticar precozmente a los pacientes más vulnerables, evitando retrasar el inicio de un tratamiento específico, así como mejorando su pronóstico. Del mismo modo, el hecho de conocer qué pacientes presentan mayor vulnerabilidad ante esta infección también ayuda a poder establecer unas medidas de prevención en los grupos de riesgo, como es la vacunación.

Por otro lado, los datos aportados ofrecen seguridad en la realización de actividades deportivas en entornos pediátricos en los que puede circular el SARS-CoV-2, demostrando una baja transmisión del mismo e incentivando de este modo a la realización de ejercicio físico que tan beneficioso es en la población pediátrica. Los resultados de este estudio, junto con otros similares, han conllevado a la “vuelta a la normalidad” en las actividades deportivas en la población pediátrica. Además, para contribuir al estudio de la transmisión de la infección, se propone el uso serológico en saliva como un método igual de válido que el *gold standard*, ofreciendo la ventaja de ser no invasivo y tener una mayor aceptación en la población pediátrica.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

El aprendizaje adquirido de cómo ha afectado la infección por SARS-CoV-2 a los pacientes pediátricos, tanto a nivel de salud física, como a nivel de salud mental y psicosocial, tiene mucho valor y nos puede ser de gran ayuda en otras futuras situaciones epidemiológicas similares, tanto en la atención hospitalaria como en cuanto a plantear medidas que sean eficaces para contener la infección sin grandes efectos colaterales.

Sería interesante poder evaluar cómo evoluciona tanto el virus como su expresión clínica en los pacientes pediátricos, teniendo en cuenta el impacto que han supuesto las reinfecciones así como la protección vacunal desde su implementación.

Por otro lado, el hecho de conocer mejor la afectación clínica de esta infección en los pacientes con factores de riesgo plantea la necesidad de mejorar las estrategias de prevención actuales, con el estudio de tratamientos profilácticos más eficaces o vacunas que demuestren una mayor duración de la protección inmunológica.

Por último, se propone validar de forma externa y con un mayor número de pacientes la escala MISSEP, para así poder mejorar su aplicabilidad; así como plantear la creación de otras escalas o herramientas basadas en inteligencia artificial, que nos ayuden a identificar a los pacientes con riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad o de ingresar.

6. CONCLUSIONES

En respuesta al primer objetivo principal de caracterizar los distintos fenotipos clínicos de la infección por Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) en los pacientes pediátricos que requieren atención hospitalaria, podemos concluir que:

1. En la Enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) en la población pediátrica, las edades extremas y la presencia de comorbilidades son factores de riesgo asociados a hospitalización y al desarrollo de formas más graves de la enfermedad.
2. La neumonía es la causa de hospitalización asociada al SARS-CoV-2 más frecuente en pediatría y suele tener buen pronóstico; por el contrario, el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C) es la causa de mayor morbi-mortalidad e ingreso en unidades de cuidados intensivos relacionada con el SARS-CoV-2 en pediatría.
3. El fenotipo del MIS-C y la sepsis es muy similar, sin embargo, existen algunas diferencias tanto en el patrón de la fiebre, como en otras características clínicas y alteración de biomarcadores asociados a inflamación que permiten distinguir entre ambas entidades.
4. La escala MISSEP (de la unión de MIS-C y SEPSIS), compuesto por 5 variables clínicas, analíticas y terapéuticas, puede ayudar en el diagnóstico diferencial al ingreso en los casos en los que existen dudas diagnósticas entre MIS-C y sepsis.

En respuesta al segundo objetivo principal de analizar la transmisión de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos dentro de cohortes controladas, podemos concluir que:

5. La realización de actividades deportivas en equipos estables y siguiendo unas medidas de prevención estrictas se asocia a un bajo riesgo de transmisión del SARS-CoV-2; sin embargo, la incidencia de la infección puede aumentar en deportes de contacto y realizados en espacios cerrados, así como cuando los participantes comparten tanto la actividad deportiva como el lugar de convivencia.
6. Las técnicas serológicas realizadas en saliva han demostrado una alta capacidad de detección de anticuerpos frente al SARS-CoV-2, con una buena correlación con las técnicas de detección de anticuerpos en sangre, además de ser de gran utilidad en la población pediátrica dado su carácter no invasivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016 Jun; 24(6):490–502
2. World Health Organization. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) [Internet]. [consultado 21 Sep 2023]. Disponible en: https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1
3. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [Internet]. [consultado 21 Sep 2023]. Disponible en: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1
4. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):497-506
5. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020 Feb 20;382(8):727-733
6. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):514-523
7. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020 Mar 19;91(1):157-160
8. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020 Feb 22;395(10224):565-574
9. Abdelrahman Z, Li M, Wang X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Front Immunol.* 2020 Sep 11;11:552909
10. World Health Organization. COVID-19 Epidemiological Update. Edition 164 published 16 February 2024 [Internet]. [consultado 13 Mar 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-16-february-2024>
11. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020 Mar;579(7798):270-273
12. Ludwig S, Zarbock A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg.* 2020 Jul;131(1):93-96
13. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 *Spike* Glycoprotein. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6
14. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 25;10:587269
15. Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66:193-292
16. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005 Dec;69(4):635-64
17. Raskin S. Genetics of COVID-19. *J Pediatr (Rio J).* 2021 Jul-Aug;97(4):378-386

18. Ahmad J, Ikram S, Ahmad F, Rehman IU, Mushtaq M. SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA polymerase (RdRp) – A drug repurposing study. *Heliyon*. 2020 Jul 23;6(7):e04502
19. Ji-eun Lee, Jae Keun Chung, Tae sun Kim, Jungwook Park, Mi hyeon Lim, Da jeong Hwang, et al. Genomic and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 strains isolated in the city of Gwangju, South Korea. *bioRxiv*. 2020;12.16.423178
20. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*. 2021 Jan 22;433(2):166725
21. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turk J Med Sci*. 2020 Apr 21;50(SI-1):549-556
22. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Mar;19(3):155-170
23. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020 Mar 11;27(3):325-328
24. National Institutes of Health. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. Updated: February 29, 2024 [Internet]. [consultado 13 Mar 2024]. Disponible en: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
25. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. [consultado 8 Oct 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
26. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022 Mar 11;375(6585):1122-1127
27. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). [Updated 2023 Aug 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [consultado 20 Sep 2023] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
28. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Nov;19(11):685-700
29. Osuchowski MF, Winkler MS, Skirecki T, Cajander S, Shankar-Hari M, Lachmann G, et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med*. 2021 Jun;9(6):622-642
30. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*. 2020 Oct 23;371:m3862
31. Gupta A, Madhavan M V., Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*. 2020 Jul;26(7):1017-1032
32. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brüggen MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020 Jul;75(7):1564-1581
33. Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front Immunol*. 2023 Aug 14;14:1116131.

34. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Jul 9;383(2):120-128
35. Wu Y, Kang L, Guo Z, Liu J, Liu M, Liang W. Incubation Period of COVID-19 Caused by Unique SARS-CoV-2 Strains: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2022 Aug 1;5(8):e2228008
36. Zaki N, Mohamed EA. The estimations of the COVID-19 incubation period: A scoping reviews of the literature. *J Infect Public Health*. 2021 May;14(5):638-646
37. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol*. 2021 Mar;93(3):1449-1458
38. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*. 2020 May 26;323(20):2052-2059
39. Ochani RK, Kumar Ochani R, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med*. 2021 Mar 1;29(1):20-36
40. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020 Mar-Apr;34:101623
41. Meyerowitz EA, Scott J, Richterman A, Male V, Cevik M. Clinical course and management of COVID-19 in the era of widespread population immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2024 Feb;22(2):75-88
42. Gao Z, Xu Y, Sun C, Wang X, Guo Y, Qiu S, et al. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19 *J Microbiol Immunol Infect*. 2021 Feb;54(1):12-16
43. da Rosa Mesquita R, Francelino Silva Junior LC, Santos Santana FM, Farias de Oliveira T, Campos Alcântara R, Monteiro Arnozo G, et al. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wien Klin Wochenschr*. 2021 Apr;133(7-8):377-382
44. Coopersmith CM, Antonelli M, Bauer SR, Deutschman CS, Evans LE, Ferrer R, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critical Illness. *Crit Care Med*. 2021 Apr 1;49(4):598-622
45. Ning Q, Wu D, Wang X, Xi D, Chen T, Chen G, et al. The mechanism underlying extrapulmonary complications of the coronavirus disease 2019 and its therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Feb 23;7(1):57
46. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad. Información clínica COVID-19 [Internet]. Oct 2021 [consultado 22 Nov 2023]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/20211028_CLINICA.pdf
47. World Health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). 2020 Feb 16 [consultado 22 Nov 2023]; Disponible en:

- <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
48. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Informe sobre la situación de COVID-19 en España. Informe COVID-19 nº 22. 13 de abril de 2020 [Internet]. [consultado 22 Nov 2023]. Disponible en:
<https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes%20COVID-19/Informe%20n%C2%BA%2022.%20Situaci%C3%B3n%20de%20COVID-19%20en%20Espa%C3%B1a%20a%2013%20de%20abril%20de%202020.pdf>
 49. Centers for Disease Control and Prevention. Demographic Trends of COVID-19 cases and deaths in the US reported to CDC [Internet]. [consultado 23 Nov 2023]. Disponible en:
<https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#demographics>
 50. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad. COVID-19 en distintos entornos y grupos de personas [Internet]. Agosto 2021. [consultado 22 Nov 2023].
Disponible en:
https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/20210802_GRUPOSPERSONAS.pdf
 51. Howard-Jones AR, Burgner DP, Crawford NW, Goeman E, Gray PE, Hsu P, et al. COVID-19 in children. II: Pathogenesis, disease spectrum and management. *J Paediatr Child Health*. 2022 Jan;58(1):46-53
 52. Viner RM, Ward JL, Hudson LD, Ashe M, Patel SV, Hargreaves D, et al. Systematic review of reviews of symptoms and signs of COVID-19 in children and adolescents. *Arch Dis Child*. 2020 Dec 17;archdischild-2020-320972
 53. Forrest CB, Burrows EK, Mejias A, Razzaghi H, Christakis D, Jhaveri R, et al. Severity of Acute COVID-19 in Children <18 Years Old March 2020 to December 2021. *Pediatrics*. 2022 Apr 1;149(4):e2021055765
 54. Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, Ferrari ME, Pusiol A, Nocerino A, et al. SARS-CoV-2 infection in children and newborns: a systematic review. *Eur J Pediatr*. 2020 Jul;179(7):1029-1046
 55. Blázquez-Gamero D, Epalza C, Cadenas JAA, Gero LC, Calvo C, Rodríguez-Molino P, et al. Fever without source as the first manifestation of SARS-CoV-2 infection in infants less than 90 days old. *Eur J Pediatr*. 2021 Jul;180(7):2099-2106
 56. Scottoni F, Giobbe GG, Zambaiti E, Khalaf S, Sebire NJ, Curry J, et al. Intussusception and COVID-19 in Infants: Evidence for an Etiopathologic Correlation. *Pediatrics*. 2022 Jun 1;149(6):e2021054644
 57. Molteni E, Sudre CH, Canas LS, Bhopal SS, Hughes RC, Antonelli M, et al. Illness duration and symptom profile in symptomatic UK school-aged children tested for SARS-CoV-2. *Lancet Child Adolesc Health*. 2021 Oct;5(10):708-718
 58. Gaythorpe KAM, Bhatia S, Mangal T, Unwin HJT, Imai N, Cuomo-Dannenburg G, et al. Children's role in the COVID-19 pandemic: a systematic review of early surveillance data on susceptibility, severity, and transmissibility. *Sci Rep*. 2021 Jul 6;11(1):13903

59. Graff K, Smith C, Silveira L, Jung S, Curran-Hays S, Jarjour J, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2021 Apr 1;40(4):e137-e145
60. Götzinger F, Santiago-García B, Noguera-Julián A, Lanaspá M, Lancella L, Calò Carducci FI, et al. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020 Sep;4(9):653-661
61. Connelly JA, Chong H, Esbenshade AJ, Frame D, Failing C, Secord E, et al. Impact of COVID-19 on Pediatric Immunocompromised Patients. *Pediatr Clin North Am*. 2021 Oct;68(5):1029-1054
62. Greenan-Barrett J, Aston S, Deakin CT, Ciurtin C. The impact of immunocompromise on outcomes of COVID-19 in children and young people-a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2023 Aug 25;14:1159269
63. Feldstein LR, Tenforde MW, Friedman KG, Newhams M, Rose EB, Dapul H, et al. Characteristics and Outcomes of US Children and Adolescents With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Compared With Severe Acute COVID-19. *JAMA*. 2021 Mar 16;325(11):1074-1087
64. Fernandes DM, Oliveira CR, Guerguis S, Eisenberg R, Choi J, Kim M, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Clinical Syndromes and Predictors of Disease Severity in Hospitalized Children and Youth. *J Pediatr*. 2021 Mar;230:23-31.e10
65. Andina-Martinez D, Alonso-Cadenas JA, Cobos-Carrascosa E, Bodegas I, Oltra-Benavent M, Plazaola A, et al. SARS-CoV-2 acute bronchiolitis in hospitalized children: Neither frequent nor more severe. *Pediatr Pulmonol*. 2022 Jan;57(1):57-65
66. Parisi GF, Indolfi C, Decimo F, Leonardi S, Miraglia del Giudice M. COVID-19 Pneumonia in Children: From Etiology to Management. *Front Pediatr*. 2020 Dec 14;8:616622
67. Tagarro A, Cobos-Carrascosa E, Villaverde S, Sanz-Santaeufemia FJ, Grasa C, Soriano-Arandes A, et al. Clinical spectrum of COVID-19 and risk factors associated with severity in Spanish children. *Eur J Pediatr*. 2022 Mar;181(3):1105-1115
68. Jimenez-García R, Nogueira J, Retuerta-Oliva A, Sainz T, Cano-Fernández J, Flores-Pérez P, et al. Pneumonia in Hospitalized Children during SARS-CoV-2 Pandemic. Is it All COVID-19? Comparison between COVID and Non-COVID Pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2021 Mar 1;40(3):e111-e113
69. Calvo Rey C, García-López Hortelano M, Tomás Ramos J, Baquero F, Navarro M, Rodrigo C, et al. Documento de manejo clínico del paciente pediátrico con infección por SARS-CoV-2. Extracto del Documento de Manejo Clínico del Ministerio de Sanidad. Redactores pertenecientes a la Asociación Española de Pediatría (AEP), Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP), Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos (SECIP) y Sociedad Española de Urgencias Pediátricas (SEUP). Agosto 2020 [Internet]. [consultado 23 Nov 2023]. Disponible en: https://www.seipweb.es/wp-content/uploads/2020/08/21_8-AEP-SEIP-SECIP-SEUP.-DOCUMENTO-DE-MANEJO-CLINICO-DEL-PACIENTE-PEDIAI%CC%80TRICO.pdf
70. Palabiyik F, Kokurcan SO, Hatipoglu N, Cebeci SO, Inci E. Imaging of COVID-19 pneumonia in children. *Br J Radiol*. 2020 Sep 1;93(1113):20200647

71. Pousa PA, Mendonça TSC, Oliveira EA, Simões-e-Silva AC. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 in children: a comprehensive review and pathophysiological considerations. *J Pediatr (Rio J)*. 2021 Mar-Apr;97(2):116-139
72. Abi Nassif T, Fakhri G, Younis NK, Zareef R, Al Amin F, Bitar F, et al. Cardiac Manifestations in COVID-19 Patients: A Focus on the Pediatric Population. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2021 Jul 16;2021:5518979
73. Riphagen S, Gomez X, Gonzalez-Martinez C, Wilkinson N, Theocharis P. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2020 May 23;395(10237):1607-1608
74. Hoste L, Van Paemel R, Haerynck F. Multisystem inflammatory syndrome in children related to COVID-19: a systematic review. *Eur J Pediatr*. 2021 Jul;180(7):2019-2034
75. Lee KH, Li H, Lee MH, Park SJ, Kim JS, Han YJ, et al. Clinical characteristics and treatments of multi-system inflammatory syndrome in children: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 May;26(9):3342-3350
76. Abrams JY, Godfred-Cato SE, Oster ME, Chow EJ, Koumans EH, Bryant B, et al. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: A Systematic Review. *J Pediatr*. 2020 Nov;226:45-54.e1
77. Whittaker E, Bamford A, Kenny J, Kaforou M, Jones CE, Shah P, et al. Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020 Jul 21;324(3):259-269
78. The Royal College of Paediatrics and Child Health. Guidance: Paediatric multisystem inflammatory syndrome temporally associated with COVID-19 [Internet]. 2020 May [consultado 1 Sep 2022]. Disponible en: <https://www.rcpch.ac.uk/resources/paediatric-multisystem-inflammatory-syndrome-temporally-associated-covid-19-pims-guidance>
79. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. 2020 [consultado 1 Sep 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/mis/mis-c/hcp_cstecdc/index.html
80. World Health Organization. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19 Scientific brief 15 May 2020 Background [Internet]. 2020 [consultado 1 Sep 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>
81. Kundu A, Maji S, Kumar S, Bhattacharya S, Chakraborty P, Sarkar J. Clinical aspects and presumed etiology of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C): A review. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2022 Mar-Apr;14:100966.
82. Godfred-Cato S, Abrams JY, Balachandran N, Jaggi P, Jones K, Rostad CA, et al. Distinguishing Multisystem Inflammatory Syndrome in Children From COVID-19, Kawasaki Disease and Toxic Shock Syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2022 Apr 1;41(4):315-323
83. K.C. S, Awasthi P, Kumar S, Angurana SK, Nallasamy K, Angrup A, et al. MIS-C Mimickers: A Case Series of Bacterial Enteritis and Sepsis Mistaken as MIS-C. *Indian J Pediatr*. 2022 Feb;89(2):206

84. Cherqaoui B, Koné-Paut I, Yager H, Bourgeois F Le, Piram M. Delineating phenotypes of Kawasaki disease and SARS-CoV-2-related inflammatory multisystem syndrome: a French study and literature review. *Rheumatology (Oxford)*. 2021 Oct 2;60(10):4530-4537
85. Rostad CA, Chahroudi A, Mantus G, Lapp SA, Teherani M, Macoy L, et al. Quantitative SARS-CoV-2 Serology in Children With Multisystem Inflammatory Syndrome (MIS-C). *Pediatrics*. 2020 Dec;146(6):e2020018242
86. Williams PCM, Howard-Jones AR, Hsu P, Palasanthiran P, Gray PE, McMullan BJ, et al. SARS-CoV-2 in children: spectrum of disease, transmission and immunopathological underpinnings. *Pathology*. 2020 Dec;52(7):801-808
87. Cantarutti N, Battista V, Stagnaro N, Labate ME, Cicenía M, Campisi M, et al. Long-Term Cardiovascular Outcome in Children with MIS-C Linked to SARS-CoV-2 Infection—An Italian Multicenter Experience. *Biology (Basel)*. 2022 Oct 8;11(10):1474
88. Andina D, Noguera-Morel L, Bascuas-Arribas M, Gaitero-Tristán J, Alonso-Cadenas JA, Escalada-Pellitero S, et al. Chilblains in children in the setting of COVID-19 pandemic. *Pediatr Dermatol*. 2020 May;37(3):406-411
89. Colmenero I, Santonja C, Alonso-Riaño M, Noguera-Morel L, Hernández-Martín A, Andina D, et al. SARS-CoV-2 endothelial infection causes COVID-19 chilblains: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of seven paediatric cases. *Br J Dermatol*. 2020 Oct;183(4):729-737
90. Mensa-Vilaró A, Vicente A, Español-Rego M, Antón J, Fabregat V, Fortuny C, et al. Chilblains outbreak during COVID-19 pandemic: A Type-I interferonopathy? *Pediatr Allergy Immunol*. 2022 Oct;33(10):e13860
91. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Mar;21(3):133-146
92. Lledó GM, Sellares J, Brotons C, Sans M, Antón JD, Blanco J, et al. Post-acute COVID-19 syndrome: a new tsunami requiring a universal case definition. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Mar;28(3):315-318
93. Vahratian A, Adjaye-Gbewonyo D, Lin JS, Saydah S. Long COVID in Children: United States, 2022. *NCHS Data Brief*. 2023 Sep;(479):1-6
94. Brodin P, Casari G, Townsend L, O'Farrelly C, Tancevski I, Löffler-Ragg J, et al. Studying severe long COVID to understand post-infectious disorders beyond COVID-19. *Nat Med*. 2022 May;28(5):879-882
95. Bellanti JA, Novak P, Faitelson Y, Bernstein JA, Castells MC. The Long Road of Long COVID: Specific Considerations for the Allergist/Immunologist. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023 Nov;11(11):3335-3345
96. Buonsenso D, Munblit D, De Rose C, Sinatti D, Ricchiuto A, Carfi A, et al. Preliminary evidence on long COVID in children. *Acta Paediatr*. 2021 Jul;110(7):2208-2211
97. Zimmermann P, Pittet LF, Curtis N. How Common is Long COVID in Children and Adolescents? *Pediatr Infect Dis J*. 2021 Dec 1;40(12):e482-e487

98. Gatell A, López N, Balaguer-Martínez J, González X, Martín R, Quezada G, et al. Prevalence, Clinical Characteristics and Risk Factors of Post-COVID-19 Condition in a Multicenter Pediatric Primary and Hospital Care Cohort. *Pediatr Infect Dis J*. 2024 Mar 1;43(3):e81-e83
99. García-Salido A, de Carlos Vicente JC, Belda Hofheinz S, Balcells Ramírez J, Slöcker Barrio M, Leóz Gordillo I, et al. Severe manifestations of SARS-CoV-2 in children and adolescents: from COVID-19 pneumonia to multisystem inflammatory syndrome: a multicentre study in pediatric intensive care units in Spain. *Crit Care*. 2020 Nov 26;24(1):666
100. Uka A, Buettcher M, Bernhard-Stirneemann S, Fougère Y, Moussaoui D, Kottanattu L, et al. Factors associated with hospital and intensive care admission in paediatric SARS-CoV-2 infection: a prospective nationwide observational cohort study. *Eur J Pediatr*. 2022 Mar;181(3):1245-1255
101. Kim TY, Kim EC, Agudelo AZ, Friedman L. COVID-19 hospitalization rate in children across a private hospital network in the United States: COVID-19 hospitalization rate in children. *Arch Pediatr*. 2021 Oct;28(7):530-532
102. Marks KJ, Whitaker M, Agathis NT, Anglin O, Milucky J, Patel K, et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Hospitalization of Infants and Children Aged 0-4 Years with Laboratory-Confirmed COVID-19-COVID-NET, 14 States, March 2020-February 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2022 Mar 18;71(11):429-436
103. Kushner LE, Schroeder AR, Kim J, Mathew R. "For COVID" or "With COVID": Classification of SARS-CoV-2 Hospitalizations in Children. *Hosp Pediatr*. 2021 Aug;11(8):e151-e156
104. Wong LSY, Loo EXL, Kang AYH, Lau HX, Tambyah PA, Tham EH. Age-Related Differences in Immunological Responses to SARS-CoV-2. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Nov-Dec;8(10):3251-3258
105. Brodin P. Why is COVID-19 so mild in children? *Acta Paediatr*. 2020 Jun;109(6):1082-1083
106. Zimmermann P, Curtis N. Why Does the Severity of COVID-19 Differ With Age?: Understanding the Mechanisms Underlying the Age Gradient in Outcome Following SARS-CoV-2 Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2022 Feb 1;41(2):e36-e45
107. Comité/Grupo de Pediatría Basada en la Evidencia de la AEP y AEPap. COVID-19 en Pediatría: valoración crítica de la evidencia [Internet]. 2022 Feb [consultado 7 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-pediatria-basada-en-evidencia/documentos/covid-19-en-pediatria-valoracion-critica-evidencia>
108. Organización Mundial de la Salud. Vías de transmisión del virus de la COVID-19: repercusiones para las recomendaciones relativas a las precauciones en materia de prevención y control de las infecciones [Internet]. 2020 [consultado 9 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>
109. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Scientific Brief: SARS-CoV-2 Transmission [Internet]. 2021 [consultado 8 Nov 2023]. Disponible en: <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570442/>
110. Endo A, Abbott S, Kucharski AJ, Funk S. Estimating the overdispersion in COVID-19 transmission using outbreak sizes outside China. *Wellcome Open Res*. 2020 Jul 10;5:67

111. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias - Ministerio de Sanidad. Información científica-técnica sobre parámetros epidemiológicos [Internet]. Enero 2022 [consultado 8 Nov 2023]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/20220113_EPIDEMIOLOGIA.pdf
112. Qiu X, Nergiz AI, Maraolo AE, Bogoch II, Low N, Cevik M. The role of asymptomatic and pre-symptomatic infection in SARS-CoV-2 transmission—a living systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Apr;27(4):511-519
113. Kelvin AA, Halperin S. COVID-19 in children: the link in the transmission chain. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jun;20(6):633-634
114. Cao Q, Chen YC, Chen CL, Chiu CH. SARS-CoV-2 infection in children: Transmission dynamics and clinical characteristics. *J Formos Med Assoc.* 2020 Mar;119(3):670-673
115. Cavallo F, Rossi N, Chiarelli F. Novel coronavirus infection and children. *Acta Biomed.* 2020 May 11;91(2):172-176
116. Jones TC, Mühlemann B, Veith T, Biele G, Zuchowski M, Hofmann J, et al. An analysis of SARS-CoV-2 viral load by patient age. *medRxiv.* 2020. 06.08.20125484
117. Ludvigsson JF. Children are unlikely to be the main drivers of the COVID-19 pandemic – A systematic review. *Acta Paediatr.* 2020 Aug;109(8):1525-1530
118. Byambasuren O, Cardona M, Bell K, Clark J, McLaws ML, Glasziou P. Estimating the extent of asymptomatic COVID-19 and its potential for community transmission: Systematic review and meta-analysis. *J Assoc Med Microbiol Infect Dis Can.* 2020 Dec 31;5(4):223-234
119. Lyngse FP, Mølbak K, Franck KT, Nielsen C, Skov RL, Voldstedlund M, et al. Association between SARS-CoV-2 Transmissibility, Viral Load, and Age in Households. *medRxiv* 2021.02.28.21252608
120. Munro APS, Faust SN. Children are not COVID-19 super spreaders: time to go back to school. *Arch Dis Child.* 2020 Jul;105(7):618-619
121. Alonso S, Alvarez-Lacalle E, Català M, López D, Jordan I, García-García JJ, et al. Age-dependency of the Propagation Rate of Coronavirus Disease 2019 Inside School Bubble Groups in Catalonia, Spain. *Pediatr Infect Dis J.* 2021 Nov 1;40(11):955-961
122. Davies NG, Klepac P, Liu Y, Prem K, Jit M, Pearson CAB, et al. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat Med.* 2020 Aug;26(8):1205-1211
123. Jordan I, de Sevilla MF, Fumado V, Bassat Q, Bonet-Carne E, Fortuny C, et al. Transmission of SARS-CoV-2 infection among children in summer schools applying stringent control measures in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis.* 2022 Jan 7;74(1):66-73
124. Mele-Casas M, Launes C, de Sevilla MF, Hernandez-Garcia M, Pons-Tomas G, Bassat Q, et al. Low transmission of SARS-CoV-2 derived from children in family clusters: An observational study of family households in the Barcelona Metropolitan Area, Spain *PLoS One.* 2022 Nov 17;17(11):e0277754
125. Soriano-Arandes A, Gatell A, Serrano P, Biosca M, Campillo F, Capdevila R, et al. Household Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Transmission and Children: A Network Prospective Study. *Clin Infect Dis.* 2021 Sep 15;73(6):e1261-e1269

126. Wedel J, Steinmann P, Štrákl M, Hriberšek M, Ravnik J. Risk Assessment of Infection by Airborne Droplets and Aerosols at Different Levels of Cardiovascular Activity. *Arch Comput Methods Eng*. 2021;28(6):4297-4316
127. Dunton GF, Do B, Wang SD. Early effects of the COVID-19 pandemic on physical activity and sedentary behavior in children living in the U.S. *BMC Public Health*. 2020 Sep 4;20(1):1351
128. Meade J. Mental Health Effects of the COVID-19 Pandemic on Children and Adolescents : A Review of the Current Research. *Pediatr Clin North Am*. 2021 Oct;68(5):945-959
129. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19 Prevention Actions [Internet]. 2023 [consultado 9 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html>
130. Organización Mundial de la Salud. Brote de enfermedad por coronavirus (COVID-19): orientaciones para el público [Internet]. 2022 [consultado 9 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public>
131. Ministerio de Sanidad - Gobierno de España. Estrategia de vacunación COVID-19 - Información oficial sobre la vacunación contra el nuevo coronavirus [Internet]. [consultado 9 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.vacunacovid.gob.es/>
132. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021 Jan 15;172:112752
133. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. 2021 [consultado 14 Nov 2023]; Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento73.pdf>
134. Shafie MH, Antony Dass M, Ahmad Shaberi HS, Zafarina Z. Screening and confirmation tests for SARS-CoV-2: benefits and drawbacks. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2023;12(1):6
135. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, García F, Melón S, Navarro D, Paño JR, Galán JC, et al. Organización del diagnóstico de SARS-CoV-2 y estrategias de optimización. 2020 Oct. [consultado 14 Nov 2023]; Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2020-COVID19-OrganizacionDiagnostico.pdf>
136. Ministerio de Sanidad Gobierno de España, Instituto de Salud Carlos III. Interpretación de las pruebas diagnósticas frente a SARS-CoV-2. 2020 Apr. [consultado 14 Nov 2023]; Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS.pdf>
137. Yahav D, Yelin D, Eckerle I, Eberhardt CS, Wang J, Cao B, et al. Definitions for coronavirus disease 2019 reinfection, relapse and PCR re-positivity. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Mar;27(3):315-318
138. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021 Feb 5;371(6529):eabf4063
139. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020 Aug;26(8):1200-1204

140. Ogega CO, Skinner NE, Blair PW, Park HS, Littlefield K, Ganesan A, et al. Durable SARS-CoV-2 B cell immunity after mild or severe disease. *J Clin Invest*. 2021 Apr 1;131(7):e145516
141. Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. *Nat Rev Genet*. 2021 Jul;22(7):415-426
142. Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, Departament de Salut - Generalitat de Catalunya. Procediment d'actuació enfront de casos d'infecció pel nou coronavirus SARS-CoV-2 [Internet]. 2022. [consultado 14 Nov 2023]; Disponible en: https://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspcat/vigilancia_salut_publica/COVID-19/protocols/procediment-actuacio-coronavirus.pdf
143. European Centre for Disease Prevention. Considerations for the use of saliva as sample material for COVID-19 testing. 2021. [consultado 14 Nov 2023]; Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/covid-19-use-saliva-sample-material-testing.pdf>
144. Russell MW, Moldoveanu Z, Ogra PL, Mestecky J. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol*. 2020 Nov 30;11:611337
145. Pisanic N, Randad PR, Kruczynski K, Manabe YC, Thomas DL, Pekosz A, et al. COVID-19 serology at population scale: SARS-CoV-2-specific antibody responses in saliva. *J Clin Microbiol*. 2020 Dec 17;59(1):e02204-20
146. Heinzl C, Pinilla YT, Elsner K, Friessinger E, Mordmüller B, Kremsner PG, et al. Non-Invasive Antibody Assessment in Saliva to Determine SARS-CoV-2 Exposure in Young Children. *Front Immunol*. 2021 Oct 8;12:753435
147. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020 May;20(5):565-574
148. Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Tratamiento del paciente pediátrico con COVID-19 y síntomas respiratorios leves-moderados [Internet]. 2023 Sep [consultado 15 Nov 2023]. Disponible en: <https://www.seipweb.es/wp-content/uploads/2023/09/Tratamiento-Cambios-COVID-leve-moderado-y-grave.-SEIP-v1.6.pdf>
149. Henderson LA, Canna SW, Friedman KG, Gorelik M, Lapidus SK, Bassiri H, et al. American College of Rheumatology Clinical Guidance for Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated With SARS-CoV-2 and Hyperinflammation in Pediatric COVID-19: Version 3. *Arthritis Rheumatol*. 2022 Apr;74(4):e1-e20
150. McArdle AJ, Vito O, Patel H, Seaby EG, Shah P, Wilson C, et al. Treatment of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *N Engl J Med*. 2021 Jul 1;385(1):11-22
151. Webb NE, Osburn TS. Characteristics of Hospitalized Children Positive for SARS-CoV-2: Experience of a Large Center. *Hosp Pediatr*. 2021 Aug;11(8):e133-e141
152. Chao JY, Sugarman A, Kimura A, Flamer S, Jing TT, Fernandes DM, et al. Factors Associated With Hospitalization in Children and Adolescents With SARS-CoV-2 Infection. *Clin Pediatr (Phila)*. 2022 Feb;61(2):159-167

153. Campbell JI, Dubois MM, Savage TJ, Hood-Pishchany MI, Sharma TS, Petty CR, et al. Comorbidities Associated with Hospitalization and Progression Among Adolescents with Symptomatic Coronavirus Disease 2019. *J Pediatr*. 2022 Jun;245:102-110.e2
154. Shane AL, Sato AI, Kao C, Adler-Shohet FC, Vora SB, Auletta JJ, et al. A pediatric infectious diseases perspective of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2020 Nov 10;9(5):596-608
155. Williams N, Radia T, Harman K, Agrawal P, Cook J, Gupta A. COVID-19 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection in children and adolescents: a systematic review of critically unwell children and the association with underlying comorbidities. *Eur J Pediatr*. 2021 Mar;180(3):689-697
156. McCormick DW, Richardson LC, Young PR, Viens LJ, Gould C V., Kimball A, et al. Deaths in Children and Adolescents Associated With COVID-19 and MIS-C in the United States. *Pediatrics*. 2021 Nov;148(5):e2021052273
157. Woodruff RC, Campbell AP, Taylor CA, Chai SJ, Kawasaki B, Meek J, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatrics*. 2022 Jan 1;149(1):e2021053418
158. Drouin O, Hepburn CM, Farrar DS, Baerg K, Chan K, Cyr C, et al. Characteristics of children admitted to hospital with acute sars-cov-2 infection in Canada in 2020. *CMAJ*. 2021 Sep 27;193(38):E1483-E1493
159. Tripathi S, Christison AL, Levy E, McGravery J, Tekin A, Bolliger D, et al. The Impact of Obesity on Disease Severity and Outcomes Among Hospitalized Children With COVID-19. *Hosp Pediatr*. 2021 Nov;11(11):e297-e316
160. Gaietto K, Freeman MC, DiCicco LA, Rauenswinter S, Squire JR, Aldewereld Z, et al. Asthma as a risk factor for hospitalization in children with COVID-19: A nested case-control study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2022 Jan;33(1):e13696
161. Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Recomendaciones de vacunación frente a gripe y COVID-19 en la temporada 2023-2024 en España. Actualización. [consultado 15 Nov 2023]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/gripe_covid19/docs/RecomendacionesVacunacion_Gripe-Covid19.pdf
162. Recher M, Leteurtre S, Javouhey E, Morin L, Baudin F, Rambaud J, et al. Risk of Admission to the Pediatric Intensive Care Unit for SARS-CoV-2 Delta and Omicron Infections *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2023 Apr 28;12(4):189-197
163. Wang L, Berger NA, Kaelber DC, Davis PB, Volkow ND, Xu R. Incidence Rates and Clinical Outcomes of SARS-CoV-2 Infection With the Omicron and Delta Variants in Children Younger Than 5 Years in the US. *JAMA Pediatr*. 2022 Aug 1;176(8):811-813
164. Butt AA, Dargham SR, Loka S, Shaik RM, Chemaitelly H, Tang P, et al. Coronavirus Disease 2019 Disease Severity in Children Infected With the Omicron Variant. *Clin Infect Dis*. 2022 Aug 24;75(1):e361-e367

165. Li J, He X, Yuan Yuan, Zhang W, Li X, Zhang Y, et al. Meta-analysis investigating the relationship between clinical features, outcomes, and severity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pneumonia. *Am J Infect Control*. 2021 Jan;49(1):82-89
166. Moreno-Noguez M, Rivas-Ruiz R, Roy-García IA, Pacheco-Rosas DO, Moreno-Espinosa S, Flores-Pulido AA. Risk factors associated with SARS-CoV-2 pneumonia in the pediatric population. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2021;78(4):251-258
167. Ozcan S, Emeksiz S, Perk O, Uyar E, Kanik Yüksek S. Severe Coronavirus Disease Pneumonia in Pediatric Patients in a Referral Hospital. *J Trop Pediatr*. 2021 Jul 2;67(3):fmab052
168. Ríos-Barnés M, Lanaspa M, Noguera-Julian A, Baleta L, De Sevilla MF, Ferri D, et al. The Spectrum of COVID-19 Disease in Adolescents. *Arch Bronconeumol*. 2021 Jan;57:84-85
169. Yurtseven A, Turan C, Güner Özenen G, Işık H, Bal ZŞ, Sertöz R, et al. Characteristics of pediatric COVID-19 patients admitted to the emergency department and factors associated with pneumonia. *Turk J Emerg Med*. 2022 Jul 1;22(3):143-148
170. Kurian J, Blumfield E, Levin TL, Liszewski MC. Imaging findings in acute pediatric coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Pediatr Radiol*. 2022 Sep;52(10):1985-1997
171. Guo Y, Xia W, Peng X, Shao J. Features Discriminating COVID-19 From Community-Acquired Pneumonia in Pediatric Patients. *Front Pediatr*. 2020 Nov 5;8:602083
172. Liu H, Liu F, Li J, Zhang T, Wang D, Lan W. Clinical and CT imaging features of the COVID-19 pneumonia: Focus on pregnant women and children. *J Infect*. 2020 May;80(5):e7-e13
173. Guitart C, Suárez R, Girona M, Bobillo-Perez S, Hernández L, Balaguer M, et al. Lung ultrasound findings in pediatric patients with COVID-19. *Eur J Pediatr*. 2021 Apr;180(4):1117-1123
174. Tsabouri S, Makis A, Kosmeri C, Siomou E. Risk Factors for Severity in Children with Coronavirus Disease 2019: A Comprehensive Literature Review. *Pediatr Clin North Am*. 2021 Feb;68(1):321-338
175. Zhou B, Yuan Y, Wang S, Zhang Z, Yang M, Deng X, et al. Risk profiles of severe illness in children with COVID-19: a meta-analysis of individual patients. *Pediatr Res*. 2021 Aug;90(2):347-352
176. Shafiek HK, El Lateef HMA, Boraey NF, Nashat M, Abd-Elrehim GAB, Abouzeid H, et al. Cytokine profile in Egyptian children and adolescents with COVID-19 pneumonia: A multicenter study. *Pediatr Pulmonol*. 2021 Dec;56(12):3924-3933
177. del Valle R, Ballesteros Á, Calvo C, Sainz T, Mendez A, Grasa C, et al. Comparison of pneumonia features in children caused by SARS-CoV-2 and other viral respiratory pathogens. *Pediatr Pulmonol*. 2022 Oct;57(10):2374-2382
178. Ng DCE, Tan KK, TING GSS, Ling C, Fadzilah NFB, TAN SF, et al. Comparison of Severe Viral Pneumonia Caused by SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses Among Malaysian Children During the COVID-19 Pandemic. *Front Pediatr*. 2022 Apr 25;10:865099
179. Wei JS. How lethal is SARS-CoV-2 pneumonia when compared with respiratory syncytial virus and influenza in young children? *Aust J Gen Pract*. 2020 Oct;49(10):683-686

180. Mania A, Faltin K, Mazur-melewska K, Małeckie P, Jończyk-potoczna K, Lubarski K, et al. Clinical picture and risk factors of severe respiratory symptoms in COVID-19 in children. *Viruses*. 2021 Nov 25;13(12):2366
181. Satdhabudha A, Chaiyakulsil C, Uppala R, Niyomkarn W, Tovichien P, Norasettekul V, et al. Development and validation of the predictive score for pediatric COVID-19 pneumonia: A nationwide, multicenter study. *PLoS One*. 2022 Aug 29;17(8):e0273842
182. Canadian Paediatric Society. Paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with COVID-19 (spring 2021 update) [Internet]. 2021 [consultado 11 Dic 2023]. Disponible en: <https://cps.ca/en/documents/position/pims>
183. American Academy of Pediatrics. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Interim Guidance [Internet]. 2023 [consultado 11 Dic 2023]. Disponible en: <https://www.aap.org/en/pages/2019-novel-coronavirus-covid-19-infections/clinical-guidance/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-mis-c-interim-guidance/>
184. Schlapbach LJ, Andre MC, Grazioli S, Schöbi N, Ritz N, Aebi C, et al. Best Practice Recommendations for the Diagnosis and Management of Children With Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2 (PIMS-TS; Multisystem Inflammatory Syndrome in Children, MIS-C) in Switzerland. *Front Pediatr*. 2021 May 26;9:667507
185. Abdel-Mannan O, Eyre M, Löbel U, Bamford A, Eltze C, Hameed B, et al. Neurologic and Radiographic Findings Associated With COVID-19 Infection in Children. *JAMA Neurol*. 2020 Nov 1;77(11):1440-1445.
186. Kostik MM, Bregel L V., Avrusin IS, Dondurei EA, Matyunova AE, Efremova OS, et al. Distinguishing Between Multisystem Inflammatory Syndrome, Associated With COVID-19 in Children and the Kawasaki Disease: Development of Preliminary Criteria Based on the Data of the Retrospective Multicenter Cohort Study. *Front Pediatr*. 2021 Nov 10;9:787353
187. Lin TA, Leo HL. Characteristics and Outcomes of US Children and Adolescents With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Compared With Severe Acute COVID-19. *Pediatrics*. 2021 Dec; 148 (Supplement 3): S75–S76
188. Rodriguez-Smith JJ, Verweyen EL, Clay GM, Esteban YM, de Loizaga SR, Baker EJ, et al. Inflammatory biomarkers in COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children, Kawasaki disease, and macrophage activation syndrome: a cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2021 Aug;3(8):e574-e584
189. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018 Mar;6(3):223-230
190. Schlapbach LJ. Paediatric sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2019 Oct;32(5):497-504
191. Weiss SL, Peters MJ, Agus MSD, Alhazzani W, Choong K, Flori HR, et al. Perspective of the Surviving Sepsis Campaign on the Management of Pediatric Sepsis in the Era of Coronavirus Disease 2019. *Pediatr Crit Care Med*. 2020 Nov;21(11):e1031-e1037

192. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020 Jan 18;395(10219):200-211
193. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005 Jan;6(1):2-8
194. Diaz F, Bustos B R, Yagnam F, Karsies TJ, Vázquez-Hoyos P, Jaramillo-Bustamante JC, et al. Comparison of Interleukin-6 Plasma Concentration in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated With SARS-CoV-2 and Pediatric Sepsis. *Front Pediatr*. 2021 Nov 15;9:756083
195. Solé-Ribalta A, Bobillo-Pérez S, Jordan-García I. A Review of Adrenomedullin in Pediatric Patients: A Useful Biomarker. *Children (Basel)*. 2022 Aug 6;9(8):1181
196. Solé-Ribalta A, Bobillo-Pérez S, Valls A, Girona-Alarcón M, Launes C, Cambra FJ, et al. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin and mid-regional pro-adrenomedullin in septic paediatric patients. *Eur J Pediatr*. 2020 Jul;179(7):1089-1096
197. Tibi R, Hadash A, Khoury A, Butbul-Aviel Y, Ben-Ari J, Shavit I. Emergency department levels of NT-proBNP and inotropic/vasoactive support in multi-inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Am J Emerg Med*. 2022 Jun;56:296-297
198. Asif IM, Chang CJ, Diamond AB, Raukar N, Zaremski JL. Returning Athletes Back to High School Sports in the COVID-19 Era: Preparing for the Fall. *Sports Health*. 2020 Nov/Dec;12(6):518-520
199. Slabaugh AD, Belk JW, Jackson JC, Robins RJ, McCarty EC, LeClere LE, et al. Managing the Return to Football During the COVID-19 Pandemic: A Survey of the Head Team Physicians of the Football Bowl Subdivision Programs. *Orthop J Sports Med*. 2021 Jan 29;9(1):2325967121992045
200. Viola TW, Nunes ML. Social and environmental effects of the COVID-19 pandemic on children. *J Pediatr (Rio J)*. 2022 Mar-Apr;98 Suppl 1(Suppl 1):S4-S12
201. Watson AM, Haraldsdottir K, Biese K, Goodavish L, Stevens B, McGuine T. The Association of COVID-19 Incidence with Sport and Face Mask Use in United States High School Athletes. *J Athl Train*. 2021 Nov 18;58(1):29–36
202. Drezner JA, Drezner SM, Magner KN, Ayala JT. COVID-19 Surveillance in Youth Soccer During Small Group Training: A Safe Return to Sports Activity. *Sports Health*. 2021 Jan/Feb;13(1):15-17
203. Meyer T, Mack D, Donde K, Harzer O, Krutsch W, Rössler A, et al. Successful return to professional men's football (soccer) competition after the COVID-19 shutdown: a cohort study in the German Bundesliga. *Br J Sports Med*. 2021 Jan;55(1):62-66
204. Lopez MJ, Mack C, Bliss T, Wasserman EB, Myers E, Solomon G, et al. Observed Versus Expected COVID-19 Infections Among National Football League Players During the 2020 Season. *Epidemiology*. 2022 Mar 1;33(2):193-199
205. Qian H, Miao T, Liu L, Zheng X, Luo D, Li Y. Indoor transmission of SARS-CoV-2. *Indoor Air*. 2021 May;31(3):639-645

206. Nishiura H, Oshitani H, Kobayashi T, Saito T, Sunagawa T, Matsui T, et al. Closed environments facilitate secondary transmission of coronavirus disease 2019 (COVID-19). medRxiv 2020.02.28.20029272
207. Leclerc QJ, Fuller NM, Knight LE, Funk S, Knight GM. What settings have been linked to SARS-CoV-2 transmission clusters? Wellcome Open Res. 2020 Jun 5;5:83
208. Sasser P, McGuire T, Haraldsdottir K, Biese K, Goodavish L, Stevens B, et al. Reported COVID-19 Incidence in Wisconsin High School Athletes in Fall 2020. J Athl Train. 2022 Jan 1;57(1):59-64
209. Herrington DM, Wierzbica TF, Alexander-Miller M, Espeland M, Bertoni AG, Mathews A, et al. Duration of SARS-CoV-2 sero-positivity in a large longitudinal sero-surveillance cohort: the COVID-19 Community Research Partnership. BMC Infect Dis. 2021 Aug 30;21(1):889
210. García-García E, Calle-Miguel L, Pérez-Solís D, Urueña IC, Merino ÁG, Gómez HH, et al. Household Transmission of SARS-CoV-2 and Long-term Immunity in Children: A Prospective Study in Northern Spain. Pediatr Infect Dis J. 2023 Mar 1;42(3):226-231
211. Karachaliou M, Moncunill G, Espinosa A, Castaño-Vinyals G, Jiménez A, Vidal M, et al. Infection induced SARS-CoV-2 seroprevalence and heterogeneity of antibody responses in a general population cohort study in Catalonia Spain. Sci Rep. 2021 Nov 3;11(1):21571
212. Butler-Laporte G, Lawandi A, Schiller I, Yao M, Dendukuri N, McDonald EG, et al. Comparison of Saliva and Nasopharyngeal Swab Nucleic Acid Amplification Testing for Detection of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Intern Med. 2021 Mar 1;181(3):353-360
213. Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. Sci Immunol. 2020 Oct 8;5(52):eabe5511
214. Chong CY, Kam KQ, Li J, Maiwald M, Loo LH, Nadua KD, et al. Saliva Is Not a Useful Diagnostic Specimen in Children With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clin Infect Dis. 2021 Nov 2;73(9):e3144-e3145.
215. Yee R, Truong TT, Pannaraj PS, Eubanks N, Gai E, Jumarang J, et al. Saliva Is a Promising Alternative Specimen for the Detection of SARS-CoV-2 in Children and Adults. J Clin Microbiol. 2021 Jan 21;59(2):e02686-20
216. Keuning MW, Grobbee M, De Groen AEC, Berman-De Jong EP, Bijlsma MW, Cohen S, et al. Saliva SARS-CoV-2 Antibody Prevalence in Children. Microbiol Spectr. 2021 Oct 31;9(2):e0073121
217. Griffin SM, Chen IM, Fout GS, Wade TJ, Egorov AI. Development of a multiplex microsphere immunoassay for the quantitation of salivary antibody responses to selected waterborne pathogens. J Immunol Methods. 2011 Feb 1;364(1-2):83-93
218. Wade TJ, Griffin SM, Egorov AI, Sams E, Hudgens E, Augustine S, et al. Application of a multiplex salivary immunoassay to detect sporadic incident norovirus infections. Sci Rep. 2019 Dec 20;9(1):19576
219. Faustini SE, Jossi SE, Perez-Toledo M, Shields AM, Allen JD, Watanabe Y, et al. Detection of antibodies to the SARS-CoV-2 spike glycoprotein in both serum and saliva enhances detection of infection. medRxiv [Preprint]. 2020 Jun 18:2020.06.16.20133025

220. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Feb;147(2):545-557.e9
221. Khan T, Rahman M, Al Ali F, Huang SSY, Ata M, Zhang Q, et al. Distinct antibody repertoires against endemic human coronaviruses in children and adults. *JCI Insight*. 2021 Feb 22;6(4):e144499
222. Nogrady B. How kids' immune systems can evade COVID. *Nature*. 2020 Dec;588(7838):382
223. Dobaño C, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Chi J, Rodrigo Melero N, et al. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl Res*. 2021 Jun;232:60-74
224. Goh YS, Chavatte JM, Lim Jieling A, Lee B, Hor PX, Amrun SN, et al. Sensitive detection of total anti-*Spike* antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19. *Cell Rep Med*. 2021 Feb 16;2(2):100193
225. Dimopoulou D, Kyritsi M, Dadouli K, Vergadi E, Tsiligianni E, Papadimitriou E, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies among children and their parents in Greece. *Eur J Pediatr*. 2023 Jan;182(1):439-449
226. Tönshoff B, Müller B, Elling R, Renk H, Meissner P, Hengel H, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 Infection in Children and Their Parents in Southwest Germany. *JAMA Pediatr*. 2021 Jun 1;175(6):586-593
227. Zeng F, Dai C, Cai P, Wang J, Xu L, Li J, et al. A comparison study of SARS-CoV-2 IgG antibody between male and female COVID-19 patients: A possible reason underlying different outcome between sex. *J Med Virol*. 2020 Oct;92(10):2050-2054
228. Zeng W, Ma H, Ding C, Yang Y, Sun Y, Huang X, et al. Characterization of SARS-CoV-2-specific antibodies in COVID-19 patients reveals highly potent neutralizing IgA. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jan 29;6(1):35.
229. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med*. 2021 Jan 20;13(577):eabd2223
230. Alkharaan H, Bayati S, Hellström C, Aleman S, Olsson A, Lindahl K, et al. Persisting Salivary IgG Against SARS-CoV-2 at 9 Months After Mild COVID-19: A Complementary Approach to Population Surveys. *J Infect Dis*. 2021 Aug 2;224(3):407-414
231. Becker M, Dulovic A, Junker D, Ruetalo N, Kaiser PD, Pinilla YT, et al. Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals. *Nat Commun*. 2021 May 25;12(1):3109
232. Pinilla YT, Heinzl C, Caminada LF, Consolaro D, Esen M, Kremsner PG, et al. SARS-CoV-2 Antibodies Are Persisting in Saliva for More Than 15 Months After Infection and Become Strongly Boosted After Vaccination. *Front Immunol*. 2021 Dec 9;12:798859
233. Sano K, Bhavsar D, Singh G, Floda D, Srivastava K, Gleason C, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces mucosal antibody responses in previously infected individuals. *Nat Commun*. 2022 Sep 1;13(1):5135