
ENE-COVID

ESTUDIO NACIONAL DE SERO-EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2 EN ESPAÑA

SEGUNDA FASE

Resumen

La desescalada y el incremento de movilidad en la “nueva normalidad”, en presencia de SARS-CoV-2 circulante, han ido acompañadas de la aparición de brotes de infección y de un número creciente de casos a lo largo de todo el país. Por este motivo, se considera oportuno poner en marcha una **segunda fase de ENECOVID**, aprovechando el trabajo previo y contactando con la misma cohorte de individuos, con el **objetivo principal** de **disponer de estimaciones actualizadas de seroprevalencia en este momento de la pandemia**. Por otra parte, es importante **estimar las tasas de sero-positivización** en población que no ha estado previamente expuesta al virus tras levantar el confinamiento y recuperar la actividad laboral y escolar.

La segunda fase de ENECOVID incluye una cuarta ronda, y posiblemente, repetir con este mismo diseño el estudio en febrero y junio de 2021, como fechas tentativas, siempre teniendo en cuenta la situación epidemiológica de COVID-19. En esta cuarta ronda se invitará a participar de nuevo a todos los participantes elegibles del estudio, invitándoles a repetir el test rápido de anticuerpos; como novedad, sin embargo, las muestras de sangre para realizar pruebas complementarias, incluyendo de nuevo la determinación de IgG mediante inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas, se obtendrán sólo en una sub-muestra seleccionada, que incluirá a todos los participantes seropositivos y a una parte de los seronegativos.

Objetivos de la cuarta ronda

1. Estimar **la seroprevalencia actual** de anticuerpos para SARS-CoV-2 en España, por Comunidades Autónomas y por provincias, así como por edad y sexo.
2. Estimar la tasa de **seroconversiones**, es decir, de presencia de anticuerpos en población no infectada durante la primera onda de la epidemia.
3. Estudiar la **evolución temporal** de la presencia de anticuerpos circulantes detectables y estudiar los factores asociados a su persistencia, en especial su relación con la presencia de síntomas.

Antecedentes

En abril de 2020, el Ministerio de Sanidad y el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), en colaboración con las Consejerías de Sanidad de todas las Comunidades y Ciudades Autónomas, con el apoyo del Instituto Nacional de Estadística, decidieron poner en marcha **ENE-COVID** (1), un **amplio estudio sero-epidemiológico longitudinal y de base poblacional**, cuyos objetivos principales son: a) **estimar la prevalencia de infección** por SARS-CoV-2 mediante la determinación de anticuerpos frente al virus en España, en cada una de las Comunidades y Ciudades Autónomas y en cada provincia, proporcionando información por edad y sexo, y b) **monitorizar la difusión de la infección a lo largo del tiempo** gracias a la realización de oleadas sucesivas del estudio en la misma cohorte de participantes. Esta estrategia está en línea con el marco general de vigilancia de COVID-19 para Europa y Reino Unido propuesto por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) (2), que recomienda disponer de estimadores periódicos de seroprevalencia a nivel nacional y regional para conocer el nivel de transmisión de SARS-CoV-2.

ENECOVID es, por tanto, una de las **herramientas básicas de la vigilancia epidemiológica de la infección por SARS-CoV-2 en España**, ya que permite estimar la infección en la población incluyendo a los casos asintomáticos y leves no diagnosticados, que también contribuyen a la transmisión de SARS-CoV-2 (3), y proporciona información sobre el estado inmunitario de la población en relación con la inmunidad mediada por anticuerpos; complementa, por tanto, la vigilancia de casos confirmados a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (**RENAVE**). **ENE-COVID** es, además, un valioso **recurso para ayudar a conocer mejor la dinámica de la infección por SARS-CoV-2** y dar respuesta a algunas de las incógnitas existentes, cuya relevancia en términos de salud pública es incuestionable.

La primera fase de **ENECOVID** se desarrolló entre abril y junio de 2020, con más de 68.000 participantes y tres rondas consecutivas (27/04-11/05, 18/05-01/06 y 08/06-22/06). Sus principales resultados y la documentación asociada están disponibles en la página web del estudio (<https://portalcne.isciii.es/enecovid19/>). En este periodo, la prevalencia estimada de anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2 en España¹ ha sido de un 5,0% (IC95%: 4,7- 5,4) en la 1ª Ronda, de 5,2% (IC95%: 4,9-5,5) en la 2ª Ronda y de 5,2% (IC95%: 4,9-5,5) en la 3ª Ronda. Según estos resultados, se estima que la letalidad de la infección en población no institucionalizada en nuestro país hasta el 15 de julio ha estado entre un 0.8% y un 1.1% (4). Gracias a su diseño, el estudio ha mostrado también la gran variabilidad geográfica en la intensidad de la primera ola de la pandemia dentro de nuestro país, proporcionando a las Consejerías de Sanidad estimaciones de prevalencia de base poblacional por comunidad autónoma y por provincia. Por otra parte, debido a su carácter longitudinal, ENE-COVID ha permitido estimar las tasas de seroconversión¹ a lo largo de esta primera fase -0,9% (IC 95%: 0,8%-1,0%) entre la Ronda 1 y 2, y 0,7% (IC 95%: 0,6-0,8) de la Ronda 2 a la 3- y cuantificar la seronegativización en personas que tenían anticuerpos frente a SARS-CoV-2, con cifras de 7,1% (IC 95%: 5,9-8,5) entre la Ronda 1 y la 2 y de un 14,4% (IC 95%: 12,7-16,3%) entre la Ronda 1 y la 3.

La situación epidemiológica de COVID-19 en España ha evolucionado mucho desde la finalización de esta primera fase, ya que la desescalada y el incremento de movilidad en la “nueva normalidad”, en presencia de SARS-CoV-2 circulante, han ido acompañadas de la aparición de brotes de infección y de

¹ Basado en las determinaciones del test rápido

un número creciente de casos a lo largo de todo el país. Por este motivo, se considera oportuno poner en marcha una **segunda fase de ENECOVID**, aprovechando el trabajo previo y contactando con la misma cohorte de individuos, con el **objetivo principal** de **disponer de estimaciones actualizadas de seroprevalencia en este momento de la pandemia**. Por otra parte, es importante **estimar las tasas de sero-positivización** en población que no ha estado previamente expuesta al virus tras levantar el confinamiento y recuperar la actividad laboral y escolar.

Contribución adicional de ENE-COVID en relación con la infección por SARS-CoV-2

El carácter longitudinal de ENE-COVID permite disponer de información de prevalencia, niveles de anticuerpos y muestras biológicas de la cohorte a lo largo del tiempo. Gracias a esto, el estudio puede proporcionar información sobre las características de esta nueva enfermedad, incluyendo aspectos muy relevantes para el desarrollo de vacunas y la puesta en marcha de programas de vacunación. Algunas de estas preguntas clave son el tiempo medio de **persistencia de los anticuerpos** en sangre en las personas que han tenido la infección, cuáles son los factores individuales asociados a la pérdida de los mismos, cuál es la proporción de personas que cuenta con **anticuerpos neutralizantes**, o si la proporción de **casos asintomáticos** ha variado en el tiempo. Esta segunda fase contempla, por tanto, el desarrollo de pruebas complementarias, para caracterizar mejor la infección, sus determinantes y su evolución.

Segunda fase de ENE-COVID: cuarta ronda

La segunda fase de ENE-COVID incluye una cuarta ronda, y posiblemente, repetir con este mismo diseño el estudio en febrero y junio de 2021, como fechas tentativas, siempre teniendo en cuenta la situación epidemiológica de COVID-19. En esta cuarta ronda se invitará a participar de nuevo a todos los participantes elegibles del estudio, invitándoles a repetir el test rápido de anticuerpos. Como novedad, sin embargo, las muestras de sangre para realizar pruebas complementarias, incluyendo de nuevo la determinación de IgG mediante inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CLIA), se obtendrán sólo en una sub-muestra seleccionada, que incluirá a todos los participantes seropositivos a IgG de rondas anteriores, ya sea por test rápido o CLIA, y con anticuerpos IgG en la ronda actual, detectados mediante el test rápido, así como a una parte de los seronegativos.

Objetivos de la cuarta ronda

1. Estimar **la seroprevalencia actual** de anticuerpos para SARS-CoV-2 en España, por Comunidades y Ciudades Autónomas y por provincias, así como por edad y sexo.
2. Estimar la tasa de **seroconversiones**, es decir, de presencia de anticuerpos en población no infectada durante la primera onda de la epidemia.
3. Estudiar la **evolución temporal** de la presencia de anticuerpos circulantes detectables y estudiar los factores asociados a su persistencia, en especial su relación con la presencia de síntomas.

Metodología

El diseño general de ENECOVID está explicado en detalle tanto en los informes disponibles en la web del estudio como en el artículo científico, publicado el pasado mes de julio, que recoge también los

resultados de la primera ronda (1). En resumen, los participantes se han seleccionado mediante un **muestreo bietápico estratificado**. Para garantizar la representatividad a nivel provincial, autonómico y nacional, el primer nivel de estratificación está constituido por las 50 provincias españolas y las 2 ciudades autónomas. Además, como la transmisión del virus SARS-CoV-2 está potencialmente relacionada con la densidad de población, el segundo nivel de estratificación corresponde al tamaño de los municipios dentro de cada provincia, agrupados en municipios de <5.000, 5.000–20.000, 20.000–100.000 y ≥ 100.000 habitantes. Dentro de cada estrato definido por la provincia y el tamaño municipal, se han seleccionado las secciones censales como unidad de muestreo de primera etapa y los hogares de cada sección censal como unidades de segunda etapa. Todas las personas residentes en el hogar son invitadas a participar en el estudio. La selección de los hogares se ha llevado a cabo por el Instituto Nacional de Estadística (INE) que cuenta con información sobre todos los hogares e individuos en España.

La manera más eficiente de incorporar participantes de todas las edades es **reclutando hogares completos**. Este planteamiento es acorde con las recomendaciones de la OMS (5). Tiene la ventaja añadida de poder **monitorizar transmisión comunitaria**, identificando los hogares que están libres de infección en un primer momento y su evolución en el tiempo. Permite también, si se desea, incorporar más adelante un subestudio específico de transmisión intrahogar, de acuerdo con los protocolos específicos para estos diseños desarrollados por la OMS (6).

Realizar rondas adicionales en la misma cohorte de personas que participaron en el estudio ENE-COVID supone ventajas logísticas y científicas. Desde el punto de vista logístico y organizativo, facilita la puesta en marcha del estudio y la información que es necesario aportar a los participantes y a los profesionales que llevarían a cabo nuevamente el estudio en los servicios de salud de las Comunidades y Ciudades Autónomas. La alta tasa de participación en las rondas previas es muy relevante.

Desde el punto de vista científico, el estudio longitudinal de los mismos participantes permite dar respuesta a aspectos que no pueden abordarse de otro modo, incluidos los objetivos 2 y 3 especificados en el apartado anterior. La existencia de una colección de muestras de las rondas previas será de gran utilidad para estos objetivos.

Cuarta ronda: diseño por objetivo

Los diferentes objetivos planteados en esta segunda fase requieren de aproximaciones diferenciadas, con diseños específicos:

- a) El estudio de seroprevalencia e identificación de nuevas infecciones con test rápido, que se realiza a toda la cohorte, no precisa adaptación. El análisis se planteará como en las rondas previas, lo que permite comparar los resultados de la cuarta ronda con las rondas anteriores.
- b) Para el estudio de seroprevalencia con CLIA, así como para las medidas de otro tipo de marcadores de interés en muestras de sangre, se seleccionará una sub-cohorte, correspondiente a un 15% de las 1500 secciones censales del proyecto seleccionadas al azar, reponderadas de acuerdo con la población de cada CCAA. La aleatorización por secciones censales facilitará la logística del trabajo de campo, permitiendo, a la vez, disponer de una estimación de seroprevalencia representativa de España. Se invitará a donar muestra de sangre a alrededor de 12.000 personas (200 secciones censales*24 hogares por sección*2,5 personas por hogar de media en ENECOVID). En las secciones censales elegidas, accedieron a venopunción en la ronda 3 cerca de 7.000 personas (ver tabla I). El diseño muestral de esta parte del estudio se explica en detalle en el anexo I.

- c) El análisis de la evolución temporal de los anticuerpos en suero se realizará en los participantes que han presentado anticuerpos IgG detectados con cualquiera de los test en alguna de las rondas del estudio. Esto supone que a este subgrupo -positivos en rondas 1-3 más los nuevos positivos que se detecten en la ronda 4- también se les invitará a donar muestra de sangre, con el fin de poder utilizar las técnicas más sensibles que permitan evaluar la variabilidad en el tiempo.

Tabla 1: Estimación inicial de número de personas en las que se realizaría venopunción en la segunda fase de ENE-COVID

CCAA	Secciones censales de ENE-COVID seleccionadas para venopunción			Participantes positivos		Total teórico [‡]	
	Participantes elegibles	Participantes efectivos en Ronda 3		Residentes en otras secciones censales	Estimación de nuevos positivos en ENE-COVID ⁺	Con todos los elegibles	Sólo con venopunción
		Test rápido	Venopunción				
Andalucía	1734	1165	949	364	114	2212	1427
Aragón	421	263	246	238	128	787	612
Asturias, Principado de	371	300	281	41	10	422	332
Baleares, Illes	438	191	173	47	32	517	252
Canarias	723	436	373	78	32	833	483
Cantabria	379	272	237	73	30	482	340
Castilla y León	642	522	475	753	152	1547	1380
Castilla - La Mancha	670	461	399	757	116	1543	1272
Cataluña	1651	1090	904	365	184	2200	1453
Comunitat Valenciana	1119	714	568	189	56	1364	813
Extremadura	408	322	295	172	38	618	505
Galicia	714	434	384	132	42	888	558
Madrid, Comunidad de	1336	864	628	419	178	1933	1225
Murcia, Región de	531	272	255	33	40	604	328
Navarra, Comunidad Foral de	345	255	230	138	66	549	434
País Vasco	584	398	346	145	96	825	587
Rioja, La	291	181	153	58	42	391	253
Ceuta	90	67	25	21	10	121	56
Melilla	98	77	44	55	18	171	117
TOTAL	12545	8284	6965	4078	1384	18007	12427

⁺Dato calculado a partir de la población de la CCAA, teniendo en cuenta las tasas de incidencia acumulada regional de COVID-19 en la RENAVE para el periodo 01/07/2020-22/09/2020, asumiendo una infradetección teórica de un 50%.

[‡] Elegibles en secciones seleccionadas +positivos de otras secciones+nuevos positivos

Determinaciones serológicas

Uno de los aspectos clave en un estudio longitudinal es la comparabilidad de la información en los diferentes momentos del tiempo. En las primeras rondas se han utilizado dos tipos de test para la **medición de anticuerpos IgG**, que, combinados, permiten maximizar la representatividad y la calidad de la información:

- a) Un **test rápido de inmunocromatografía (Orient Gene Biotech COVID-19 IgG/IgM)**, que proporciona resultados in situ, que se pueden facilitar en el momento a los participantes, y no

requiere venopunción. Esta técnica, según la información aportada por el fabricante, utiliza la inmunocromatografía con oro coloidal en formato *point-of-care*, en muestras de sangre, suero/plasma, y ofrece el resultado en 10 minutos. En los estudios de fiabilidad realizados para ENECOVID (1), este test mostró una sensibilidad y especificidad del 82,1% y del 100% respectivamente. Otros estudios han encontrado cifras similares o mejores (7).

- b) Una **determinación de anticuerpos IgG** realizada mediante **inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CLIA) (ARCHITECT de Abbott)**. Según el fabricante, tiene una sensibilidad del 100% en casos confirmados tras 14 días del inicio de síntomas y una especificidad del 99,6%. En nuestro estudio de fiabilidad, la sensibilidad rozó el 90% (89,7%), mientras que la especificidad fue del 100%. Otros trabajos reportan resultados similares (8).

Encuesta epidemiológica

Como en las rondas previas, en cada domicilio se recogerá la información del **cuestionario del hogar**, que permite registrar la composición y características del mismo, haciendo un censo de los posibles participantes que existen en esa morada para poder calcular las tasas de participación. Posteriormente, cada participante responderá a un **cuestionario epidemiológico individual** que recoge las características de los participantes, permite clasificarles como negativos, asintomáticos, o personas con COVID-19 presente o pasada, y explora hábitos y posibles fuentes de infección.

Recogida de la información y seguimiento del trabajo de campo

Se aprovechará la experiencia previa para poner de nuevo en marcha la aplicación web que facilite la obtención rápida de información. Toda esta información, incluyendo los resultados de los tests rápidos, se recogerá directamente en una base central de datos que permita hacer el seguimiento instantáneo de la información, con el fin de permitir al Centro Nacional de Epidemiología ir haciendo los análisis de la situación. Se pondrán en marcha de nuevo las vías de consulta para participantes que se establecieron en cada CCAA para resolver las dudas de los participantes (líneas de teléfono, correos electrónicos...), así como el mail genérico de ENECOVID, que sigue en funcionamiento.

Trabajo de campo

Como en las tres rondas previas, el trabajo de campo de la cuarta ronda, en colaboración con todas las CCAA, se llevará a cabo en dos semanas. Idealmente, se organizará en dos mitades: en la semana 1 se contactará con las personas que se estudiaron en la primera semana de cada ronda y los demás participantes, en la segunda semana. No obstante, en aquellas regiones donde no sea factible esta separación, debido a dificultades logísticas o de los propios participantes, se priorizará maximizar la participación permitiendo juntar ambas cohortes durante el periodo de reclutamiento.

	Cuarta ronda	
	Sem. 1	Sem. 2
Cohorte A: 18.000 hogares (12 hogares de las 1.500 secciones)	■	
Cohorte B: 18.000 hogares (12 hogares de las 1.500 secciones)		■

Contacto telefónico e invitación a participar

A partir de la información facilitada por el INE para los domicilios seleccionados, como en rondas anteriores se contactará telefónicamente con los mismos para censar a las personas residentes en dichos domicilios e invitarles a participar. Cuando se disponga de más de un teléfono por hogar, si la llamada no es respondida se utilizará el siguiente número y sucesivos para maximizar la probabilidad de contacto. En caso de no obtener respuesta a ninguno de ellos, se repetirá la operación un mínimo de 5 veces en distintas bandas horarias. Si los 5 intentos son infructuosos se clasificará el domicilio como ilocalizable. Si, eventualmente, se hacen las rondas 5 y 6, se volverá a repetir el intento de localización de dichos domicilios que siguen formando parte del universo muestral del estudio y serán incluidos en la oleada correspondiente siempre y cuando acepten participar.

Una vez establecido el contacto telefónico:

- Se informará del objetivo y características del estudio en esta segunda fase
- Se confirmará la disposición a participar.
- Se obtendrá información sobre las personas presentes en dicho domicilio (personas a incluir en el estudio) y algunas características del mismo (*encuesta del hogar*, similar a las rondas previas)
- Se establecerá la cita de la entrevista.
- Se recabará información sobre los miembros del hogar que, por su situación laboral, necesiten un certificado para justificar ante su empresa, centro de trabajo o centro educativo el tiempo de ausencia correspondiente a la participación en el estudio.

Información del resultado proporcionada a los participantes

Como en las rondas anteriores, se informará a los participantes de los resultados del test rápido, insistiendo en las características de esta información, que no permite ser utilizada para considerar el estatus infectivo de los participantes. Se insistirá en la necesidad de seguir el circuito establecido en la CCAA para el diagnóstico de COVID-19 si el participante tiene síntomas y la necesidad de seguir las recomendaciones de las autoridades sanitarias. En la subcohorte con muestras biológicas, se establecerá un procedimiento consensuado con las CCAA para informar de los resultados de las mismas, cuando dichos resultados estén disponibles. Además, se ha preparado una lista de posibles preguntas frecuentes para responder a las dudas y aclaraciones que los participantes puedan plantear. Este listado se irá actualizando a medida que se constate que existen otro tipo de dudas/preguntas no suficientemente contestadas aquí.

Encuestadores, entrenamiento

Se reactivará el programa específico para la formación de los encuestadores, particularmente relevante en el caso del personal sanitario y no sanitario que participe en esta fase y no haya participado en las rondas anteriores. El programa mantiene los siguientes objetivos: a) que las personas implicadas conozcan el estudio en profundidad para que puedan obtener los consentimientos informados individuales, respondiendo a las dudas que los participantes puedan tener; b) que conozcan las herramientas disponibles para la recogida de información y los criterios establecidos para homogenizar estas tareas y c) que lleven a cabo los procedimientos de recogida de muestras, así como la aplicación del test de acuerdo con los protocolos establecidos y las especificaciones técnicas del mismo, para garantizar la calidad de la información obtenida en el proyecto. El programa se adaptará a las novedades incorporadas en esta segunda fase, incluyendo los nuevos protocolos de extracción y manejo de las muestras biológicas a recoger en la subcohorte.

Análisis estadístico

Para los dos primeros objetivos del estudio (estimar la seroprevalencia y las tasas de seroconversión por CCAA, provincia, edad y sexo) el análisis estadístico será similar al planteado en las rondas previas (1). Siguiendo el procedimiento de análisis utilizado en la primera fase de ENECOVID, las estimaciones de las tasas de seroprevalencia de IgG frente a SARS-CoV-2 se llevarán a cabo asignando a cada participante del estudio un peso de muestreo inversamente proporcional a su probabilidad de selección, ajustado adicionalmente por la tasa de no respuesta específica según sexo, grupo de edad y nivel de renta relativo de la sección censal. Debido al diseño complejo del estudio, en el cálculo del error estándar para los correspondientes intervalos de confianza, todos los análisis tendrán en cuenta, además del efecto de la estratificación por provincia y tamaño municipal, el efecto de la agrupación por hogares y secciones censales.

Dado que para el total de la muestra sólo se dispondrá de los datos del test rápido, se llevará a cabo una corrección de las estimaciones de prevalencia considerando las características intrínsecas de dicho test, es decir, la sensibilidad y especificidad reportadas en los estudios que han validado dicha herramienta, incluyendo el estudio de fiabilidad llevado a cabo en la fase anterior de ENECOVID. Por otra parte, sí se contará con datos representativos a nivel nacional de prevalencia medida con CLIA; se usarán pesos específicos para este análisis.

Para el estudio de la evolución temporal de los anticuerpos y su asociación con otras variables de interés se utilizarán modelos de medidas repetidas, que tengan en cuenta la correlación existente entre las observaciones procedentes de un mismo participante. En estos modelos también se ponderarán las observaciones obtenidas teniendo en cuenta el efecto del muestreo y la tasa de no respuesta.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Además, se ha solicitado una evaluación específica para esta segunda fase, que incorpora nuevos objetivos. Como es preceptivo, se informará a los participantes de la finalidad del estudio, del propósito con el que se recogen y utilizarán sus muestras, así como de todos sus derechos en relación con el uso y protección de sus datos, incluidos expresamente los derechos de acceso, rectificación, supresión, limitación, oposición a su tratamiento y portabilidad de los datos. Para ello, se ha elaborado un nuevo documento de consentimiento informado para cada miembro del hogar, incluyendo un documento de asentimiento para los menores (8-15 años) con el fin de que comprendan el estudio, y uno para los padres o titulares de la patria potestad de menores o personas discapacitadas.

El tratamiento de los datos cumplirá con los requisitos establecidos en la legislación vigente, teniendo en cuenta, además, las consideraciones del gabinete jurídico de la Agencia Española de Protección de Datos en relación con esta epidemia ([NRef: 0017/2020](#)). El convenio entre las instituciones de la Administración General del Estado (INE, Ministerio de Sanidad, ISCIII) en el que se regulan las cesiones de datos personales entre ellas, dentro del marco legal actual, continúa en vigor. Se renovará el acuerdo con las CCAA para compartir la información necesaria para la realización del estudio y proporcionarles los resultados obtenidos.

Como se ha comentado, la participación en el estudio puede tener beneficios secundarios para los participantes: por un lado, las personas participantes podrán disponer de información adicional sobre su propia exposición al coronavirus que causa COVID-19; por otro, recibirán de forma directa la

información sobre las recomendaciones establecidas por el Ministerio de Sanidad para garantizar la protección de los participantes y convivientes.

Referencias

1. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Oteo J, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet Lond Engl*. 2020 22;396(10250):535–44.
2. ECDC. Monitoring and evaluation framework for COVID-19 response activities in the EU/EEA and the UK. Interim guidance. 2020 Jun p. 92.
3. WHO. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
4. Pastor-Barriuso R, Perez-Gomez B, Hernan MA, Perez-Olmeda M, Yotti R, Oteo J, et al. SARS-CoV-2 infection fatality risk in a nationwide seroepidemiological study. *medRxiv*. 2020 Aug 7;2020.08.06.20169722.
5. WHO. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 virus infection [Internet]. WHO; 2020 [cited 2020 Apr 3]. Report No.: WHO/2019-nCoV/Seroepidemiology/2020.1. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1273768/retrieve>
6. WHO. Household transmission investigation protocol for 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) infection V 1.1 [Internet]. WHO; 2020 [cited 2020 Apr 3]. Report No.: WHO/2019-nCoV/Seroepidemiology/2020.1. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1272252/retrieve>
7. Dellièrè S, Salmona M, Minier M, Gabassi A, Alanio A, Le Goff J, et al. Evaluation of the COVID-19 IgG/IgM Rapid Test from Orient Gene Biotech. *J Clin Microbiol*. 2020 23;58(8).
8. Patel E, Bloch EM, Clarke W, Hsieh Y-H, Boon D, Eby YJ, et al. Comparative performance of five commercially available serologic assays to detect antibodies to SARS-CoV-2 and identify individuals with high neutralizing titers. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci*. 2020 Sep 2;

Anexo I: DISEÑO MUESTRAL DE LA SUBCOHORTE CON VENOPUNCIÓN

A partir de la muestra nacional seleccionada en la primera fase del estudio ENECOVID, se seleccionará una subcohorte aleatoria para la realización del inmunoensayo con venopunción en la segunda y posteriores fases del estudio. La subcohorte tendrá representatividad nacional y constituirá una muestra bietápica estratificada por Comunidad Autónoma de la población española no institucionalizada, con las secciones censales como unidad de muestreo de primera etapa y los hogares de cada sección censal como unidades de segunda etapa.

Precisión esperada en la subcohorte

Por limitaciones logísticas y temporales, se ha establecido a priori que la subcohorte con venopunción no debería exceder las 200 secciones censales, lo que corresponderá aproximadamente a 12.000 personas (media de 2,5 personas en los 24 hogares seleccionados por sección censal). Asumiendo que un 50% de las personas seleccionadas den su consentimiento a participar en la segunda fase del estudio y donen una muestra de sangre, se tendría una muestra efectiva de 6.000 personas para el inmunoensayo con venopunción. Para un efecto de diseño próximo a 4 (factor de inflación de la varianza por la correlación entre personas de una misma sección censal y unidad familiar) y un nivel de confianza del 95%, este tamaño muestral otorgará una precisión del $\pm 1,1\%$ para estimar una seroprevalencia nacional subyacente del 5% y del $\pm 1,5\%$ para una seroprevalencia del 10%.

Asignación de la subcohorte por Comunidades Autónomas

Dada la elevada heterogeneidad de tamaños autonómicos, las 200 secciones censales de la subcohorte se distribuirán por Comunidades Autónomas según una asignación de compromiso. Un 35% de la muestra (70 secciones censales) se asignará de forma uniforme, lo que corresponderá a 4 secciones censales en cada una de las 17 Comunidades Autónomas, más una sección adicional en las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla. El 65% restante de la muestra (130 secciones censales) se distribuirá de forma proporcional al tamaño poblacional de cada Comunidad Autónoma. De esta forma, se garantizará un mínimo de 5 secciones censales por comunidad, sin comprometer la eficiencia de las estimaciones nacionales de la seroprevalencia de SARS-CoV-2. La distribución de secciones censales por Comunidad Autónoma se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de las 200 secciones censales de la subcohorte con venopunción por Comunidad Autónoma, estudio ENE-COVID.

Comunidad Autónoma (<i>i</i>)	Población* (<i>N_i</i>)	Asignación		Secciones censales† (<i>m_i</i>)
		Uniforme	Proporcional	
Andalucía	8,414,240	4	23	27
Aragón	1,319,291	4	4	8
Asturias	1,022,800	4	3	7
Baleares	1,149,460	4	3	7
Canarias	2,153,389	4	6	10
Cantabria	581,078	4	2	6
Castilla-La Mancha	2,032,863	4	6	10
Castilla y León	2,399,548	4	7	11
Cataluña	7,675,217	4	21	25
Comunidad Valenciana	5,003,769	4	14	18

Comunidad Autónoma (<i>i</i>)	Población* (<i>N_i</i>)	Asignación		Secciones censales† (<i>m_i</i>)
		Uniforme	Proporcional	
Extremadura	1,067,710	4	3	7
Galicia	2,699,499	4	7	11
La Rioja	316,798	4	1	5
Madrid	6,663,394	4	18	22
Murcia	1,493,898	4	4	8
Navarra	654,214	4	2	6
País Vasco	2,207,776	4	6	10
Ceuta	84,777	1	0	1
Melilla	86,487	1	0	1
Total	47,026,208	70	130	200

* Población por Comunidad Autónoma a 1 de enero de 2019 obtenida del Instituto Nacional de Estadística.

† Número de secciones censales sumando ambas asignaciones.

Selección de la subcohorte en cada Comunidad Autónoma

Las secciones censales correspondientes a la subcohorte se muestrearán a partir de las ya seleccionadas en la cohorte completa del estudio ENE-COVID. No obstante, como la cohorte completa tiene su propio diseño muestral (mayor nivel de estratificación por provincia y tamaño municipal), será necesario realizar un muestreo ponderado de la cohorte para que la subcohorte resultante constituya en sí misma una muestra bietápica estratificada por Comunidad Autónoma de la población española no institucionalizada.

El muestreo se realizará por separado en cada Comunidad Autónoma. La subcohorte estará formada por m_i secciones censales de la Comunidad Autónoma i (última columna de la Tabla 1), que serán seleccionadas mediante un muestreo aleatorio ponderado sin reemplazamiento a partir de todas las secciones censales de dicha comunidad en la cohorte completa, asignando a las secciones pertenecientes a la provincia j un peso inversamente proporcional a la fracción de muestreo de la provincia m_{ij}^*/N_{ij} en la cohorte completa,

$$w_{ij} = \frac{N_{ij}}{m_{ij}^* N_i},$$

donde m_{ij}^* es el número de secciones censales seleccionadas en la provincia j de la comunidad i en la cohorte completa, N_{ij} es la población provincial y N_i es la población autonómica (constante de proporcionalidad para que los pesos asignados a las secciones censales sumen 1 en cada Comunidad Autónoma). Estos pesos de muestreo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Pesos de muestreo asignados a las secciones censales de la cohorte completa, estudio ENE-COVID.

Provincia (<i>j</i>)	Población* (<i>N_{ij}</i>)	Secciones censales† (<i>m_{ij}</i> [*])	Pesos de muestreo‡ (<i>w_{ij}</i>)
Andalucía			
Almería	716,820	23	0.0037
Cádiz	1,240,155	30	0.0049
Córdoba	782,979	24	0.0039
Granada	914,678	26	0.0042
Huelva	521,870	21	0.0030

Provincia (j)	Población* (N_{ij})	Secciones censales† (m_{ij}^*)	Pesos de muestreo‡ (w_{ij})
Jaén	633,564	22	0.0034
Málaga	1,661,785	35	0.0056
Sevilla	1,942,389	39	0.0059
Aragón			
Huesca	220,461	19	0.0088
Teruel	134,137	17	0.0060
Zaragoza	964,693	36	0.0203
Asturias			
Asturias	1,022,800	40	0.0250
Baleares			
Baleares	1,149,460	41	0.0244
Canarias			
Las Palmas	1,120,406	34	0.0153
Tenerife	1,032,983	33	0.0145
Cantabria			
Cantabria	581,078	35	0.0286
Castilla-La Mancha			
Albacete	388,167	21	0.0091
Ciudad Real	495,761	23	0.0106
Cuenca	196,329	18	0.0054
Guadalajara	257,762	19	0.0067
Toledo	694,844	27	0.0127
Castilla y León			
Ávila	157,640	17	0.0039
Burgos	356,958	20	0.0074
León	460,001	22	0.0087
Palencia	160,980	17	0.0039
Salamanca	330,119	20	0.0069
Segovia	153,129	17	0.0038
Soria	88,636	16	0.0023
Valladolid	519,546	23	0.0094
Zamora	172,539	17	0.0042
Cataluña			
Barcelona	5,664,579	86	0.0086
Girona	771,044	24	0.0042
Lleida	434,930	20	0.0028
Tarragona	804,664	25	0.0042
Comunidad Valenciana			
Alicante	1,858,683	40	0.0093
Castellón	579,962	22	0.0053
Valencia	2,565,124	49	0.0105
Extremadura			
Badajoz	673,559	31	0.0203
Cáceres	394,151	24	0.0154
Galicia			
A Coruña	1,119,596	33	0.0126
Lugo	329,587	20	0.0061
Ourense	307,651	19	0.0060
Pontevedra	942,665	30	0.0116
La Rioja			
La Rioja	316,798	33	0.0303
Madrid			
Madrid	6,663,394	100	0.0100

Provincia (<i>j</i>)	Población* (N_{ij})	Secciones censales† (m_{ij}^*)	Pesos de muestreo‡ (w_{ij})
Murcia			
Murcia	1,493,898	45	0.0222
Navarra			
Navarra	654,214	36	0.0278
País Vasco			
Álava	331,549	20	0.0075
Gipuzkoa	723,576	27	0.0121
Bizkaia	1,152,651	34	0.0154
Ceuta			
Ceuta	84,777	15	0.0667
Melilla			
Melilla	86,487	15	0.0667

* Población por provincia a 1 de enero de 2019 obtenida del Instituto Nacional de Estadística.

† Número de secciones censales seleccionadas por provincia en la cohorte completa.

‡ Pesos de muestreo asignados a las secciones censales de la cohorte completa.

La probabilidad de que cualquier sección censal de la población resulte seleccionada en la subcohorte será el producto de su probabilidad de selección en la cohorte completa y la probabilidad de inclusión en la subcohorte condicionada a su selección previa en la cohorte. Como las secciones de la cohorte se muestrearon con probabilidad proporcional a su tamaño dentro de cada provincia, la probabilidad de inclusión en la cohorte completa de la sección censal k de la provincia j vendrá dada por

$$P(S_{\text{cohorte}}) = m_{ij}^* \frac{N_{ijk}}{N_{ij}},$$

donde N_{ijk} es el tamaño poblacional de la sección censal k . Además, una vez seleccionada en la cohorte, la probabilidad de inclusión en la subcohorte de la sección censal k de la provincia j de la comunidad i será aproximadamente igual a

$$P(S_{\text{subcohorte}} | S_{\text{cohorte}}) \approx m_i w_{ij} = \frac{m_i N_{ij}}{m_{ij}^* N_i},$$

donde m_i es el número de secciones censales de la Comunidad Autónoma i seleccionadas en la subcohorte y w_{ij} es el peso de muestreo asignado a cada una de las secciones de la provincia j . Multiplicando ambas probabilidades, la probabilidad total de que la sección censal k sea seleccionada en la subcohorte será

$$P(S_{\text{subcohorte}}) \approx m_i \frac{N_{ijk}}{N_i},$$

que es proporcional al tamaño poblacional de la sección censal dentro de su Comunidad Autónoma. Así, la subcohorte resultante corresponderá a una muestra bietápica estratificada por Comunidad Autónoma, donde las secciones censales (unidades de muestreo de primera etapa) serán seleccionadas con probabilidad proporcional a su tamaño. La subcohorte estará finalmente constituida por todas las personas residentes en los 24 hogares muestreados (unidades de segunda etapa) dentro de cada una de las secciones censales seleccionadas por este procedimiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SUBCOHORTE CON VENOPUNCIÓN

El análisis de la subcohorta estará restringido a la obtención de estimaciones de la seroprevalencia de SARS-CoV-2 mediante el inmunoensayo con venopunción dentro del ámbito nacional. Como la subcohorta no se seleccionará de forma proporcional al tamaño de cada Comunidad Autónoma (Tabla 1), la estimación de la seroprevalencia de SARS-CoV-2 a nivel nacional se realizará asignando a cada participante de la subcohorta un peso de muestreo inversamente proporcional a su probabilidad de selección (esto es, el inverso de la fracción de muestreo en cada Comunidad Autónoma). En la Tabla 3 se presentan las fracciones de muestreo y los correspondientes pesos por Comunidad Autónoma.

Tabla 3. Fracciones y pesos de muestreo de la subcohorta por Comunidad Autónoma, estudio ENECOVID.

Comunidad Autónoma	Población*	Muestra†	Fracción de muestreo‡	Peso de muestreo§
Andalucía	8,414,240	1,620	0.754	1.325
Aragón	1,319,291	480	1.426	0.701
Asturias	1,022,800	420	1.609	0.621
Baleares	1,149,460	420	1.432	0.698
Canarias	2,153,389	600	1.092	0.916
Cantabria	581,078	360	2.428	0.412
Castilla-La Mancha	2,032,863	600	1.157	0.865
Castilla y León	2,399,548	660	1.078	0.928
Cataluña	7,675,217	1,500	0.766	1.306
Comunidad Valenciana	5,003,769	1,080	0.846	1.182
Extremadura	1,067,710	420	1.542	0.649
Galicia	2,699,499	660	0.958	1.044
La Rioja	316,798	300	3.711	0.269
Madrid	6,663,394	1,320	0.776	1.288
Murcia	1,493,898	480	1.259	0.794
Navarra	654,214	360	2.156	0.464
País Vasco	2,207,776	600	1.065	0.939
Ceuta	84,777	60	2.774	0.361
Melilla	86,487	60	2.719	0.368
Total	47,026,208	12,000		

* Población por Comunidad Autónoma a 1 de enero de 2019 obtenida del Instituto Nacional de Estadística.

† Muestra de la subcohorta por Comunidad Autónoma, resultante de los 24 hogares muestreados de un tamaño medio de 2,50 personas dentro de cada sección censal.

‡ Fracción de muestreo en cada Comunidad Autónoma relativa a la fracción de muestreo total.

§ Peso de muestreo igual al inverso de la fracción de muestreo en cada Comunidad Autónoma.

Debido al diseño complejo de la subcohorta (selección de hogares –unidades de segunda etapa– dentro de secciones censales –unidades de primera etapa– estratificadas por Comunidad Autónoma), todos los análisis estadísticos a nivel nacional tendrán en cuenta el efecto de la estratificación por Comunidad Autónoma y la agregación de residentes por hogares y secciones censales en el error estándar de la seroprevalencia estimada de SARS-CoV-2 y en su intervalo de confianza.