大韓獸醫學會誌(2008) 第48卷 第4號
Korean J Vet Res(2008) 48(4) : 457~462

추백리-가금티푸스의 혈청학적 모니터링 계획수립을 위한 표본크기

박선일[1,*] · 박최규[2]

[1]강원대학교 수의학부대학 및 동물의학종합연구소, [2]국립수의과학검역원

(게재승인: 2008년 10월 2일)

Determination of sample size to serological surveillance plan for pullorum disease and fowl typhoid

Son-Il Pak[1,*], Choi-Kyu Park[2]

[1]*School of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

[2]*National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea*

(Accepted: October 2, 2008)

Abstract : The objective of this study was to determine appropriate sample size that simulated different assumptions for diagnostic test characteristics and true prevalences when designing serological surveillance plan for pullorum disease and fowl typhoid in domestic poultry production. The number of flocks and total number of chickens to be sampled was obtained to provide 95% confidence of detecting at least one infected flock, taking imperfect diagnostic tests into account. Due to lack of reliable data, within infected flock prevalence (WFP) was assumed to follow minimum 1%, most likely 5% and maximum 9% and true flock prevalence of 0.1%, 0.5% and 1% in order. Sensitivity were modeled using the Pert distribution: minimum 75%, most likely 80% and maximum 90% for plate agglutination test and 80%, 85%, and 90% for ELISA test. Similarly, the specificity was modeled 85%, 90%, 95% for plate agglutination test and 90%, 95%, 99% for ELISA test. In accordance with the current regulation, flock-level test characteristics calculated assuming that 30 samples are taken from per flock. The model showed that the current 112,000 annual number of testing plan which is based on random selection of flocks is far beyond the sample size estimated in this study. The sample size was further reduced with increased sensitivity and specificity of the test and decreased WFP. The effect of increasing samples per flock on total sample size to be sampled and optimal combination of sensitivity and specificity of the test for the purpose of the surveillance is discussed regarding cost.

Keywords : fowl typhoid, pullorum disease, sample size, serosurveillance, simulation

서 론

Salmonella(*S.*) *pullorum*에 의한 추백리(pullorum disease)와 *S. gallinarum*에 의한 가금티푸스(fowl typhoid)는 닭과 칠면조에 병원성이 매우 높고 다양한 임상증상과 폐사율을 동반하는 전형적인 난계대 전염병으로 알려져 있다 [10, 13]. 이들 질병의 병원체는 *Salmonella* group D에 속하는 동일한 항원구조를 갖고 있어 혈청학적으로 구분하기 어렵기 때문에 동일한 맥락에서 방제대책을 시행하고 있다 [1, 12]. 우리나라에서는 이 질병을 제2종 가축전염병으로 지정하여 관리하고 있으며 특히 추백리 근절대책으로 정기적인 혈청학적인 모니터링을 실시하여 양성계를 도태하는 정책을 시행하고 있다 [5]. 2006년도 사업결과에 의하면 항체양성율은 전국적으로 0.36% 수준으로 매우 낮고, 충남지역(대전광역시 포함)은 상대적으로 높은 1.2% 수준을 보이고 있는 등 지역

*Corresponding author: Son-Il Pak
School of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[Tel: +82-33-250-8672, Fax: +82-33-244-2367, E-mail: paksi@kangwon.ac.kr]

별로 차이가 있는 것으로 조사되었다 [3]. 살모넬라 감염증을 방제하기 위한 노력으로 사균백신 개발과 생균백신 보급을 비롯한 다양한 치료 및 예방대책이 시도되어 왔으나 *Salmonella* 균의 낮은 면역원성 [8, 10], 난계대 전염 [9, 10], 숙주 세포 내 잠복감염 [6, 14] 등의 특성 때문에 국내에서 산발적인 발생은 지속되고 있다. 김 등 [1]은 검사대상 종계의 정기적인 검색 불이행과 살처분 대상 감염계의 약제 처치나 농장단계의 biosecurity 불이행 등을 질병 방제의 어려움으로 보고하였으며 특히 가금티푸스의 경우 종계에 대한 생균백신 사용에 대해서는 추가 검토가 필요하다고 지적하였다.

국가 단위에서 질병 감시활동(surveillance) 계획을 수립할 때에는 다양한 사항을 고려해야 하지만 가장 중요한 것은 국가방역 사업계획의 목표에 부합하는 적절한 표본크기를 결정하는 것이다. 그 이유는 통계학적으로 타당성이 있는 표본을 대상으로 하였을 경우에만 조사결과에 근거하여 모집단의 특성을 정확하게 추론할 수 있기 때문이다 [15]. 현재 우리나라에서는 추백리-가금티푸스에 대한 방역정책의 방향은 혈청학적 모니터링을 통하여 양계 농가의 피해 최소화와 방역정책 수립의 기초 자료로 활용하는 것을 목표로 추진하고 있으며 연간 112,000 수 이상을 검사하고 있다 [4, 5]. 따라서 본 연구에서는 추백리-가금티푸스의 혈청 유병율이 낮다는 가정하에서 현행 방역사업의 일환으로 수행되고 있는 본 질병에 대한 혈청검사 사업의 목표를 질병 비발생 증명(본 연구에서 비발생은 추백리-가금티푸스 양성계를 검출하여 제거함으로써 궁극적으로 청정화를 달성한다는 것으로 반드시 양성계가 없음을 의미하는 것이 아님)으로 가정할 때 이러한 목표를 달성할 수 있는 적절한 표본크기를 결정함으로써 방역예산의 효율적인 집행을 위한 기초 자료로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

진단방법과 표본크기 계산을 위한 모수가정

현행 실험실 검사로는 혈청에 대하여 평판응집반응검사(serum plate agglutination test)를 적용한다. 이 검사에서 양성반응을 보인 시료에 대하여 비특이적인 반응을 배제하고 *Salmonella* group D 항체를 검출하기 위하여 ELISA 검사를 실시하고 양성일 경우에만 감염으로 확진하는 방법을 사용하고 있다. 추백리방역실시요령 [2, 3]에 의하면 계사 당 30수씩 무작위로 채혈하는 규정에

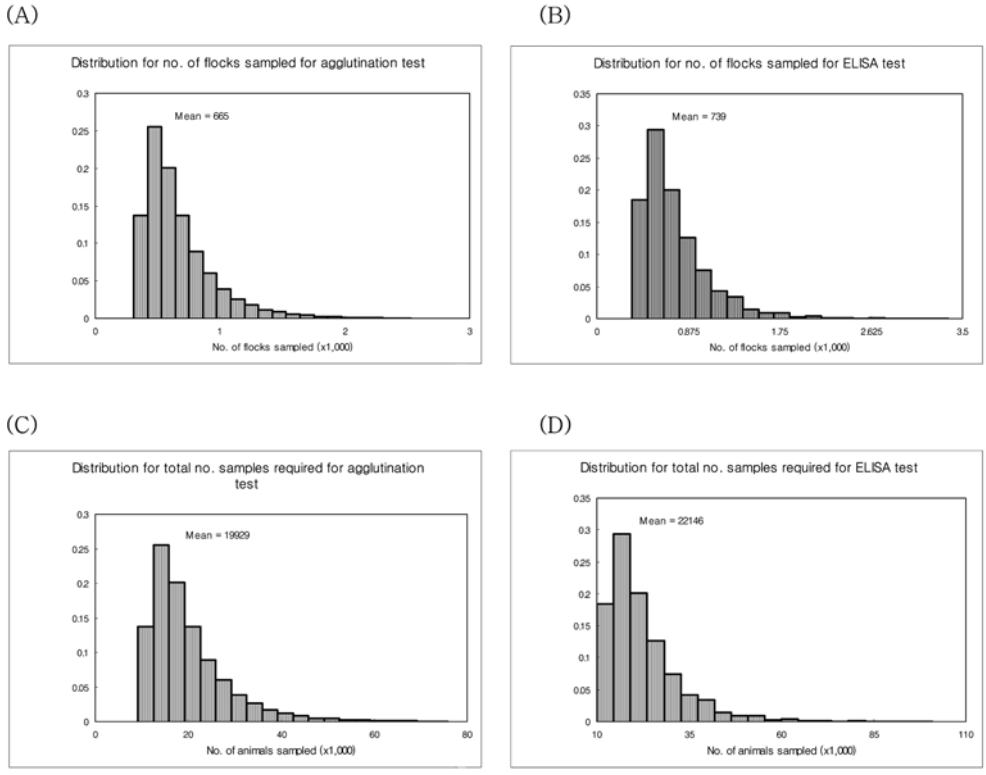

Fig. 1. Number of flocks (A = agglutination test, B = ELISA) and animals (C = agglutination test, D = ELISA) to be sampled generated by 5,000 iterations. Y-axis represents relative frequency.

근거하여 계군 당 표본 수는 30으로 고정하였고, 계군 내 유병율(within infected flock prevalence, WFP)에 대한 국내 자료가 없기 때문에 최소 1%, 최빈 5%, 최대 9%를 가정하였다. 계군 수준에서 유병율의 참값(true prevalence)은 2006년도 혈청검사결과 [5]에 근거하여 0.1%, 0.5%, 1%로 가정하여 현성유병율(apparent prevalence)을 계산하였다 [11]. 검사의 특성과 관련하여 평판응집검사의 민감도(sensitivity)는 75%, 80%, 90%, 특이도(specificity)는 85%, 90%, 95%, ELISA 검사의 민감도는 80%, 85%, 90%, 특이도는 90%, 95%, 99%를 가정하여 각각 Pert 분포를 적용하였다. 계군을 검사하는데 소요되는 비용과 개체 단위를 검사하는데 소요되는 비용의 비를 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1등 세 가지로 가정하여 조사에 소요되는 비용의 변화를 비교하였다.

표본크기 결정

두 검사의 민감도(Se)와 특이도(Sp)를 각각 Se1, Se2, Sp1, Sp2라고 할 때 두 검사에서 모두 음성일 경우에만 음성으로 판정할 경우 무작위로 선발된 n수의 개체가 두 검사에서 음성일 확률(PN)은 $[WFP(1 - Se1Se2) + (1 - WFP)(1 - (1 - Sp1)(1 - Sp2))]^n$이므로 계군 수준에서의 민감도(HSe)는 1 – PN, 특이도(HSp)는 WFP = 0을 가정하여 계산하였다. 계군의 수는 표본크기에 비하여 모집단의 크기가 매우 크다는 가정에서 현성유병율을 사용하여 95% 신뢰수준에서 계산하였고, 총 표본크기는 계군의 수에 계군 당 30수를 곱하여 계산하였다. 표본크기를 계산하기 위한 모의시험은 @Risk 소프트웨어(Palisade Corporation, USA)를 이용하여 Latin Hypercube 표본추출법으로 5,000회의 반복시험으로 계산하였다.

결 과

분석에서 가정한 민감도와 특이도를 적용할 때 평판응집검사와 ELISA에서 요구되는 계군 수와 개체 수는 Fig. 1과 같다. 1차 검사인 평판응집검사의 경우 평균 665개(최소 308, 최대 2,529) 계군에 총 19,929수(최소 9,240, 최대 75,870)를 검사하는 것으로 분석되었다. 감시활동에 필요한 최종검사 두수는 평균 739개(최소 335, 최대 3,364) 계군에 총 22,146수(최소 10,050, 최대 100,920)로 계산되었다. 전술한 모수 가정하에서 ELISA

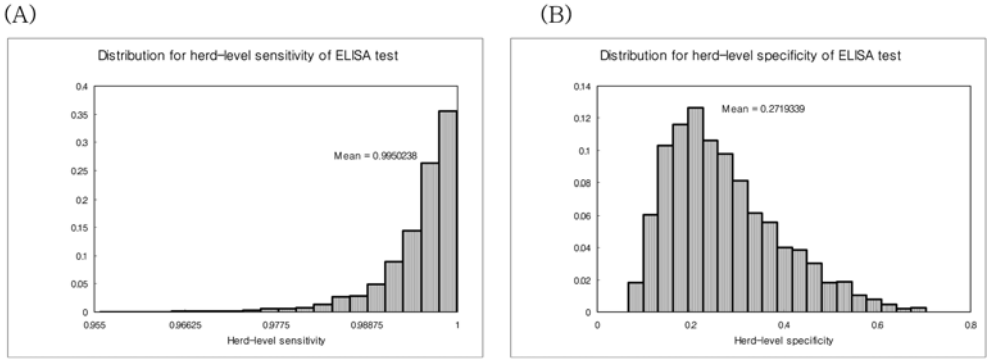

Fig. 2. Herd-level sensitivity (A) and specificity (B) of the ELISA test, generated by 5,000 iterations. Y-axis represents relative frequency.

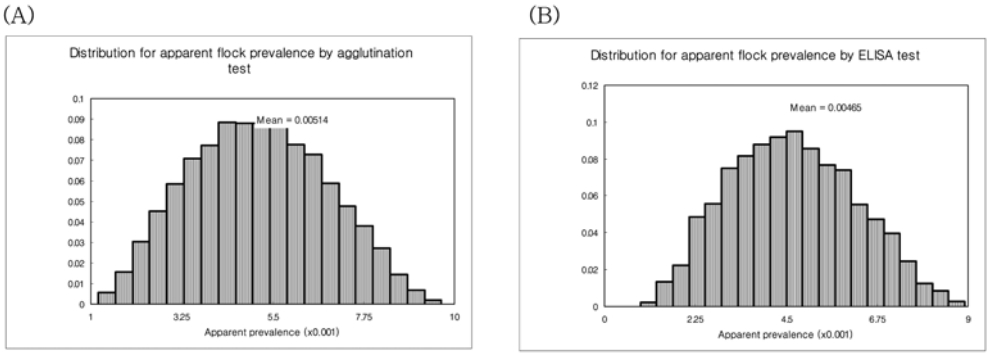

Fig. 3. Apparent flock prevalence (A = agglutination test, B = ELISA) generated by 5,000 iterations. Y-axis represents relative frequency.

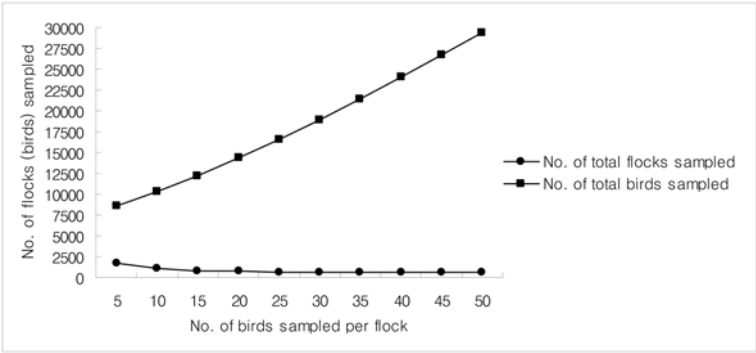

Fig. 4. The effect of sampling scenarios with an increasing number of birds per flock tested (5,000 iterations).

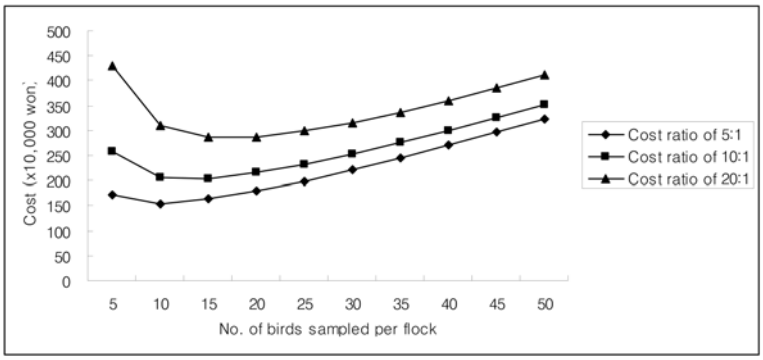

Fig. 5. Combinations of number of flocks, and number of birds per flock with 3 different hypothetical ratios of herd to animal cost.

최소 95.6%, 최대 99.9%), 평균 27.2%(최소 6.7%, 최대 70.6%)로 추정되었다(Fig. 2). 한편, 유병율의 참값을 계군 수준의 민감도로 보정한 현성유병율은 평판응집검사의 경우 평균 0.51%(최소 0.12%, 최대 0.97%), ELISA는 0.46%(최소 0.01%, 최대 0.89%)로 나타났다(Fig. 3). 계군 당 검사 두수를 변화시킬 때 선발해야 할 계군 수와 총 개체 수를 분석한 결과 30수 이상에서는 계군 수에는 큰 변화가 없는 반면 총 개체 수는 일정하게 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4). 계군을 검사하는데 소요되는 비용과 개체 단위를 검사하는데 소요되는 비용의 비를 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1등 세가지로 가정하여 최소비용을 분석한 결과 5 : 1에서는 계군 당 10수이고 나머지 2개의 시나리오에서는 15수로 분석되었다(Fig. 5).

고 찰

혈청학적 감시프로그램에 필요한 표본크기를 계산할 경우 연구대상 질병의 역학적 특성, 모집단 크기, 진단검사의 특성, 계군 간 및 계군 내 유병율, 신뢰수준, 표본추출 방법, 조사의 목적 등에 따라 다양한 방법을 선택할 수 있다. 특히 조사비용이 고정되어 있을 경우에는 조사의 목적(유병율 추정과 질병 비발생 증명)에 따라 표본크기를 신중하게 결정해야 한다 [15]. 본 연구에서 사용한 모수의 분포와 단순무작위추출법을 가정할 때 연간 검사 수는 평균 약 22,000건(최대 약 100,000건)으로 분석되었으며 이는 항체양성율 검출을 목적으로 연간 약 112,000건을 검사하는 현 수준과 비교할 때 상당한 차이를 보인다. 이러한 표본크기는 비발생 증명을 사업의 목표로 가정하였기 때문에 사업의 목표를 유병율 추정으로 가정하면 그 차이는 더욱 클 것으로 예상된다. 본 연구에서 계산된 표본크기를 현 수준과 비교할 때 몇 가지 사항을 고려해야 한다. 분석모형과 관련하여 모의시험에 투입된 모수에 대한 국내 자료가 빈약하여 가정에 근거한 추정치를 사용하였기 때문에 표본크기 계산에 영향을 미칠 수 있다는 점이다. 특히 현성유병율을 계산하기 위하여 WFP의 참값을 2006년도 혈청검사결과를 사용하였지만 엄밀한 의미에서 현행 혈청학적 조사에서 얻는 자료는 계군 간 혹은 계군 내 유병율로 구분하여 해석하기 어렵다. 따라서 실제 WFP 수준이 가정치 보다 낮으면 표본크기는 증가할 수 있다. 또한 검

사의 민감도와 특이도가 본 연구의 가정치 보다 낮거나 WFP 수준이 높을 경우에도 표본크기는 증가한다. 마지막으로 표본추출방법과 관련하여 본 연구에서는 단순무작위추출법을 가정하였지만 다단계추출법(multi-stage sampling)을 사용한다면 표본크기는 계산된 값 보다 증가할 수 있다.

추백리-가금티푸스에 대한 혈청학적 감시사업의 목적을 질병 비발생 증명으로 가정할 때 계군 당 30수를 채혈하는 상황에서 계군 당 검사 두수를 5-50수까지 증가시킬 때 선발할 계군 수와 총 검사 두수를 비교한 결과 30수 이상에서는 계군 수는 변화가 작은 반면 총 개체수는 일정하게 증가하는 양상을 보였으며(Fig. 4) 이는 동일한 신뢰수준에서 조사비용이 불필요하게 증가할 수 있기 때문에 조사의 비용을 최소화하기 위해서는 계군 수와 계군 당 선발 수에 대한 적절한 조합이 필요함을 의미한다 [7]. 따라서 현행 규정하에서 표본크기에 영향을 미치는 다른 요인을 고정할 때 계군 선발에 소요되는 비용과 계군 내 개체를 선발할 때 소요되는 비용을 비교하여 30수 내외에서 가장 적절한 표본크기를 결정하는 것이 바람직한 것으로 사료된다. 만일 추백리-가금티푸스와 같이 유병율이 매우 낮아 질병 비발생 증명이 사업의 목적이라면 실제로 감염되어 있는 모든 계군을 검출할 수 있는 신뢰수준이 높아야 하므로 계군 당 검사 수를 증가시킬 필요가 있다.

조사의 비용과 더불어 한가지 이상의 검사를 동시에 사용하는 경우 양성/음성을 판단하는 전략에 따라 계군 수준(flock-level)에서 검사의 특성이 변한다. 현행 추백리-가금티푸스 진단절차는1차 검사법인 혈청평판응집반응에서는 민감도를 증가시켜 감염계로 의심이 되는 모든 닭을 스크리닝하는 것이 목적이고, 2차 검사법인 ELISA 검사는 평판응집반응검사에 비하여 특이도가 높기 때문에 1차 검사에서 나타난 가양성(false positive) 개체를 선별하는 과정을 거친다. 결과적으로 이러한 검사체계는 특이도를 높이기 위한 연속시험(serial testing)의 형태이며, 계군 당 검사 수를 30 이상으로 증가시킬 경우 계군 수준에서 특이도는 미약하게 증가하는 반면 민감도는 상대적으로 뚜렷하게 감소하는 것으로 분석되었다. 따라서 계군 수준에서 검사의 민감도와 특이도 중 어느 특성을 더 중요하게 고려하는지는 사업의 목적에 따라 적절히 판단해야 하며 그 결과는 표본크기 결정에 영향을 미친다 [7]. 일반적으로 개체 수준에서 검사의 민감도와 특이도는 사전에 설정한 유의수준을 유지하는데 필요한 표본크기에 영향을 미치며 결국 조사의 검정력(statistical power)에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [14]. 민감도가 낮으면 가음성(false negative) 결과를 보상하기 위하여 표본크기가 증가해야 하며 혈청학적 조사의 검정력이 저하된다. 반면에 특이도는 표본크기 자체에 영향을 미치지 않지만 가양성 결과의 위험 때문에 검정력에 심각한 영향을 미칠 수 있으며 이는 조사 결과 질병 비발생 상황을 질병 발생상황으로 잘못된 결론을 얻을 확률이 높아진다는 것을 의미한다. 이러한 상황은 유병율이 매우 낮을 경우 가음성 보다는 가양성 결과가 더 높은 비율로 나타나기 때문에 특히 질병 비발생 증명을 위한 조사에서는 특이도를 높이는 전략이 필수적임을 의미한다. 계군 수준에서 검사의 특성은 표본크기와 감염 계군으로 판정하기 위한 양성 개체 수의 기준점(cutoff number of reactors)을 고려하여 연구자가 판단해야 하며 이는 조사의 비용과도 관련이 있다. 즉 계군 수준의 특이도를 높이면 선발해야 할 계군 수는 감소하고, 이러한 계군 수준의 민감도와 특이도를 달성하기 위하여 계군 당 선발할 수는 증가하기 때문에 이 때의 조사 비용이 최적화되는 것으로 보고되었다 [7]. 특히 개체 검사에 소요되는 비용에 대한 계군 검사에 소요되는 비용의 비를 세 수준으로 조정할 때 다양한 조합이 가능하기 때문에 계군 수준의 민감도와 특이도를 선택할 때 선발할 계군 수와 계군 당 검사 수에 대한 적절한 균형이 이루어지도록 결정해야 한다. 본 연구에서 가정한 모수에 대한 신뢰할만한 자료를 확보함으로써 국내 가축질병 근절대책의 일환으로 시행되고 있는 혈청학적 감시활동 계획에 대하여 비용을 고려한 종합적인 평가가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

질병 수준을 파악하기 위한 감시활동 사업을 수립할 때 통계적으로 유효한 적정수준의 표본크기는 조사 결과로부터 모집단의 특성을 추론하는데 필수적일 뿐만 아니라 정부의 한정된 방역사업 예산을 효율적으로 배분하고 성과를 극대화시키는 중요한 요인이다. 본 연구에서는 국내 추백리-가금티푸스에 대한 혈청학적 감시사업에서 표본크기가 적절하게 수립되어 있는지를 알아보고자 모의시험을 이용하여 평가하였다. 본 사업의 목표가 질병 비발생 증명이고 분석에서 전제로 한 가정에 근거할 때 현행 계획의 적절성에 대하여 전반적으로 재검토할 필요성이 있는 것으로 나타났다. 또한 계군 수준의 유병율과 계군 내 유병율 등 분석에 필요한 모수에 대한 국내 자료가 매우 제한적임을 고려할 때 이러한 기초 자료 수집에 대한 선행연구가 절실히 요구된다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 국립수의과학검역원 용역연구사

업(과제번호: Z-AD21-2008-08-01)으로 수행되어 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. **김애란, 김재홍, 이영주, 조영미, 권준헌, 권용국, 이윤정, 최준구, 조성준, 김민철, 이은경, 김창섭, 양홍구, 곽상익, 성환우, 모인필.** 2003년 국내 원종계 및 종계의 추백리-가금티푸스 감염실태. 대한수의학회지 2006, **46,** 347-353.
2. **농림부**. 추백리방역실시요령. 농림부고시 제 1999-25호. 농림부, 과천, 1999.
3. **농림부.** 종계장, 부화장 방역관리 요령. 농림부고시 제 2004-74호. 농림부, 과천, 2004.
4. **농림부.** 2006년 가축방역사업계획 및 실시요령. 농림부, 과천, 2006.
5. **농림부.** 2007년 가축방역사업계획 및 실시요령. 농림부, 과천, 2007.
6. **Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA.** Host specificity of *Salmonell*a infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system. Infect Immun 1994, **62**, 4602-4610.
7. **Cameron AR, Baldock FC.** Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. Prev Vet Med 1998, **34**, 19-30.
8. **Horsfall DJ, Rowley D, Jenkin CR.** The titre of bactericidal antibody against *Salmonella gallinarum* in chicks. Immunology 1970, **18**, 595-598.
9. **Johnson DC, Keenum KG, Perry HP.** A fowl typhoid outbreak in a chicken breeder flock. Avian Dis 1977, **21**, 716-719.
10. **Pomeroy BS, Nagaraja KV.** Fowl typhoid. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW Jr (eds.) Disease of Poultry. 9th ed. pp. 87-99, Iowa State University Press, Ames, 1991.
11. **Rogan WJ, Gladen B.** Estimating prevalence from the results of a screening test. Am J Epidemiol 1978, **107,** 71-76.
12. **Shivaprasad HL.** Pullorum disease and fowl typhoid. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (eds.) Disease of Poultry. 10th ed. pp. 82-96, Iowa State University Press, Ames, 1997.
13. **Snoeyenbos GH. Pullorum disease.** In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW Jr (eds.) Disease of Poultry. 9th ed. pp. 73-86, Iowa State University Press, Ames, 1991.
14. **Turnbull PC, Snoeyenbos GH.** Experimental salmonellosis in the chicken. 2. Fate of a temperature-sensitive filamentous mutant. Avian Dis 1974, **18**, 178-185.
15. **Ziller M, Selhorst T, Teuffert J, Kramer M, Schlüter H**. Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. Prev Vet Med 2002, **52**, 333-343.