

## 소 모기매개 바이러스성 질병의 Vector 감염률 추정을 위한 표본추출 전략

박선일<sup>1</sup>

강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소

(게재승인: 2011년 4월 11일)

### A Sampling Strategy for Estimating Infection Rate in Vector Mosquitoes of Mosquito-borne Bovine Viral Diseases

Son-II Pak<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract :** Mosquitoes are the vectors of a number of viral diseases in cattle, such as Akabane disease, bovine ephemeral fever, Aino virus infection, Chuzan virus infection, and Ibaraki disease. These diseases are transmitted from an infected animal to a non-infected host via the blood feeding of the vector. In Korea, the National Veterinary Research and Quarantine Services, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries is responsible for planning, implementation, laboratory investigations and reporting the results of the national surveillance program for mosquito-borne bovine diseases (MBD). The surveillance program, which was started in 1993, focused to determine the seroprevalence of each disease in cattle herds in space and time. From the epidemiological point of view, more important component of the surveillance program is to monitor infection rates in vectors for specific pathogens because this information is essential for a more precise understanding the dynamics of these diseases in a given environment and for determining risk of transmission. The aim of this study was to describe and compare methods for estimation of vector infection rates using maximum likelihood (MLE) and minimum infection rate in pooled samples. Factors affecting MLE such as number of pools, pooling size and diagnostic test performance are also discussed, assuming some hypothetical sampling scenarios for MBD.

**Key words :** sampling strategy, vector infection rate, mosquito-borne disease, cattle.

## 서 론

소의 아카바네병(Akabane disease), 아이노바이러스감염증(Ainivirus infection), 추잔병(Chuzan virus infection), 유행열(bovine ephemeral fever), 이바라기병(Ibaraki disease)을 포함하는 절지동물매개 바이러스성 질병은 모기 등 흡혈곤충에 의해 바이러스가 전파되어 감염된 임신우에서 유·사산을 포함한 번식장애와 유량감소, 발육부진, 파행 등의 증상을 유발한다(21,27). 현재까지 이들 질병으로 인한 피해를 줄이는 가장 효과적인 수단은 백신접종에 의한 면역수준 유지와 벡터(vector) 모기 서식지에서 감염원을 구제하는 예방조치외에 특별한 치료법이 없다.

우리나라에서는 농림수산물부의 가축방역사업 계획 및 실시요령에 의거 국립수의과학검역원에서는 1993년 이후 매년 전국적으로 이들 5종의 질병에 대한 혈청학적 항체역가

조사를 시행하고 있다. 능동 감시프로그램으로 시행하고 있는 본 사업은 질병발생 추이분석, 예측, 발생주의보 발령 등 방역대책 수립을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 농장과 도축장에서 질병 당 3,000두를 채혈하여 연간 약 15,000건을 혈청중화시험법(serum neutralization test)으로 검사하고 있다. 검사주기는 2001-2004년 기간에는 봄, 가을 연2회 검사에서 2005년부터 가을 1회로 축소하여 시행하고 있다. 최근 4년간 국내 모기매개성 질병은 아카바네병의 경우 2006년과 2007년 각 2건, 2009년 1건이 보고되었으며, 유행열은 2007년 1건으로 발생 수준이 매우 낮다. 한편 2005-2008년간 5개 질병의 전국 항체양성율이 연간 7.2-62.8%로 상당한 변동을 보이고 있으며, 백신을 접종하는 아카바네병은 24.3-43.1%로 변동 폭이 상대적으로 좁지만 지역별 편차는 매우 심한 것으로 조사되었다(1). 2008년 조사에서 제주도를 제외한 내륙 지방 중 중부지역인 경기도(16.2%) 및 강원도(11.7%)에서 낮게 형성되었으며 아카바네병(33%)을 제외한 4개 질병은 30%이하의 항체양성율을 보였으며 특히 유행열에 대한 백신 항체양성율은 7.2%로 가장 낮은 것으로 조사되었다. 우리나라

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : paksi@kangwon.ac.kr

라의 소모기매개질병에 대한 혈청검사계획은 숙주에서의 항체수준 평가를 목표로 하고 있지만 지역별 년도별 항체양성율의 편차가 심하고 최근에는 일정한 주기성이 없는 발생양상을 보인다는 점을 감안할 때 이들 질병에 대한 향후 방역 대책을 수립하고 발생을 예측하기 위해서는 다양한 정보를 수집할 필요가 있다. 즉 항체양성율과 더불어 국내에 서식하는 벡터모기의 종류와 항원양성율, 계절에 따른 벡터모기의 감염강도, 벡터모기의 서식밀도와 숙주 감염의 연관성, 벡터모기의 시간과 공간적 특이성, 숙주 특이성, 전파주기 (transmission cycle) 등에 관한 자료는 매우 유용한 정보로 활용될 수 있다(18).

흔히 벡터에서의 감염률은 많은 개체를 포집하여 검사하게 되는데 감염률이 낮을 경우 모든 시료에서 검사음성일 가능성이 있기 때문에 검사 목표를 감염된 모기를 검출하는 수준으로 설정하고, 감염률이 높으면 감염수준을 파악하기 위한 유행률 추정으로 설정한다. 특히 감염률이 매우 낮을 경우 감염된 모기를 검출하기 위해서는 방대한 시료를 검사해야 하며 이 경우 조사비용이 증가하기 때문에 벡터 감시시스템에서는 흔히 합병시료(pooled sample)를 검사한다(5,6,13). 합병시료에 대한 검사결과를 분석하는 방법으로는 최소감염률(minimum infection rate, MIR)과 최대우도법(maximum likelihood estimation, MLE)의 두가지 방법이 사용된다. MIR은 벡터 감염률 연구에 가장 널리 사용되며 양성 pool에서 오직 1개의 감염개체가 있다는 가정이 유효할 때 즉 감염률이 매우 낮을 때 유효한 방법이다(2,5,11,22,29,31). 한편 합병시료에서 감염개체의 비율을 추정하는 MLE는 확률모형을 이용하여 추정하는 방법으로 MIR법의 단점을 보완하고 보다 신뢰할 수 있는 구간추정치를 얻을 수 있는 장점이 있다(12,13,26,30). 본 연구는 소모기매개질병에 대한 벡터모기에서의 감염률을 추정하기 위하여 합병시료에 대한 가상의 검사 시나리오에 대하여 MLE를 응용하는 방법을 제시함으로써 혈청검진사업의 개선안을 제시하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 표본추출 시나리오

MIR과 MLE의 특성을 평가하기 위하여 300마리의 벡터모기를 포집한다고 가정하였다. 표본추출 강도는 pooling size를 고정형(constant pooling size, 시나리오 A-D)과 변동형(variable pooling size, 시나리오 E-J)으로 구분하여 pool의 개수를 각각 3-10개, 4-10개 범위로 임의적으로 구성하였다(Table 1). 표본추출 강도에 따라 MIR과 MLE 추정치의 변동성을 파악하기 위하여 합병시료 당 벡터모기의 수에 대한 다양한 조합을 가정한 것이다. 분석의 목적으로 각 시나리오에서 2개의 양성 pool이 확인되었고 이들 양성 pool은 각각의 표본추출 강도 중 첫 두 번째 pool에서 검출된 것으로 가정하였다.

### 벡터 감염률 추정

MIR은 양성 pool의 개수를 총 검사수로 나누어 모기 1,000마리 당 감염률로 계산하였다. MLE는 주어진 검사결과를 관찰할 가능성이 가장 높은 감염률을 확률모형 즉 양성 pool에서 감염된 개체의 분포에 대한 이항확률분포를 이용하는 방법으로 Walter 등(30)의 방법을 사용하였다. 즉 pool size  $m$ , pool size가  $m$ 인 pool의 개수  $n_m$ , 양성 pool의 개수  $x_m$ , 감염률의 참값을  $P$  ( $Q=1-P$ )라고 할 때 우도함수(likelihood function,  $L$ )를 최대화하는 값을 반복(numerical iteration)으로 계산한다.

$$L = \prod_m (1 - Q^m)^{x_m} Q^{m(n_m - x_m)}$$

감염률과 95% 신뢰구간은 SAS 패키지(SAS Institute, Cary NC)를 사용하여 추정하였다. 진단검사의 특성이 감염률에 미치는 영향을 검토하기 위하여 동일한 pooling size를 가정하여 민감도(Se)와 특이도(Sp)에 대한 감염률의 변화를

**Table 1.** Hypothetical scenario of sampling intensity to compute vector infection rate in samples of 300 mosquitoes

Scenario	Sampling intensity	
	No. of pools	No. of mosquitoes per pool
A: constant pooling size	10	30 (1)*, 30 (1), 30, 30, 30, 30, 30, 30, 30, 30
B: constant pooling size	6	50 (1), 50 (1), 50, 50, 50, 50
C: constant pooling size	5	60 (1), 60 (1), 60, 60, 60
D: constant pooling size	3	100 (1), 100 (1), 100
E: variable pooling size	10	40 (1), 40 (1), 40, 40, 30, 30, 30, 30, 10, 10
F: variable pooling size	6	100 (1), 80 (1), 60, 40, 10, 10
G: variable pooling size	6	90 (1), 60 (1), 60, 30, 30, 30
H: variable pooling size	5	180 (1), 60 (1), 20, 20, 20
I: variable pooling size	5	80 (1), 80 (1), 60, 60, 20
J: variable pooling size	4	90 (1), 80 (1), 70, 60

\*Values in parentheses indicate positive pools.

**Table 2.** Summary of vector infection rate using minimum infection rate (MIR) and maximum likelihood estimation (MLE) with corresponding 95% confidence interval, assuming 2 positive pools of each scenario

Scenario	Total no. of vectors	No. of pools	No. of positive pools	Infection rate (CI) <sup>1</sup>	
				MIR	MLE
A	300	10	2	6.7	52.2 (22.9 - 104.6)
B	300	6	2	6.7	21.7 (6.6 - 53.2)
C	300	5	2	6.7	15.2 (3.7 - 41.1)
D	300	3	2	6.7	15.2 (3.7 - 41.1)
E	300	10	2	6.7	48.0 (21.2 - 94.1)
F	300	6	2	6.7	17.1 (5.3 - 40.0)
G	300	6	2	6.7	18.4 (5.7 - 43.5)
H	300	5	2	6.7	11.1 (2.8 - 28.6)
I	300	5	2	6.7	13.5 (3.3 - 35.6)
J	300	4	2	6.7	8.7 (1.4 - 27.4)

\*For analysis purpose, positive pools were assumed to be detected in the first 2 pools of each scenario. In scenario J, for example, positive results were obtained from the first 2 pools (90 and 80, respectively).

<sup>1</sup>Infection rate per 1,000 mosquitoes.

MLE 방법으로 평가하였다(6,28). 즉 pool size  $m$ , pool의 개수  $n$ , 검사음성 pool의 개수를  $k$ 라고 할 때 감염률( $p$ )은  $p = 1 - [(Se - (n - k)/n) / (Se + Sp - 1)]^{1/m}$ 의 공식을 사용하였다. 진단검사의 특성으로 민감도와 특이도를 75-100%의 범위에 대하여 양성 pool의 개수를 2개로 가정하여 감염률의 변화를 평가하였다.

으며 이러한 결과는 변동형 pooling size(시나리오 E-J)에서도 동일한 양상을 보였다(Table 2). 한편 검사의 민감도와 특이도를 완벽하지 않다고 가정할 때 MLE 방법으로 추정된 감염률은 pool의 개수가 적을수록 상대적으로 큰 영향을 받고, pool의 개수가 증가할수록 진단검사의 특성에 따른 감염률의 변화는 작은 것으로 분석되었다(Fig 1).

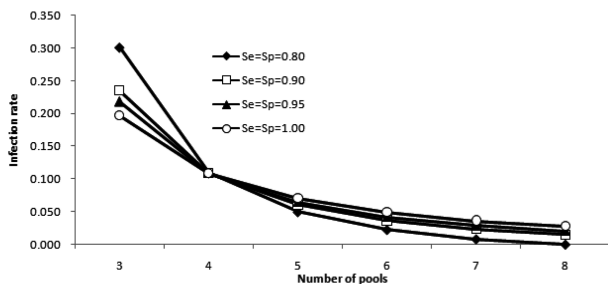
## 결 과

표본추출 강도에 따른 MIR과 MLE법에 의한 감염률을 비교한 결과 양성 pool의 개수를 2개로 고정하였기 때문에 모든 시나리오에서 MIR은 모기 1000마리 당 6.7로 계산되며, MLE는 시나리오에 따라 8.7-52.2로 다양한 값을 보였다(Table 2). 특히 시나리오 A와 E에서 감염률이 가장 높게 추정되었고 시나리오 H와 J에서 가장 낮아 pool의 개수가 작을수록 감염률이 낮게 추정되었다. 즉 고정형 pooling size(시나리오 A-D)에서 pool의 개수가 10일 때 52.2인 반면(시나리오 A) pool의 개수가 3일 때 15.2(시나리오 D)로 나타났

## 고 찰

합병시료에 대한 검사는 개별시료를 혼합하여 pool을 구성하고 이들 pool을 하나의 실험단위로 간주하여 검사하는 방법이다. 특히 대규모의 시료를 검사해야 하는 질병 감시프로그램에서 매우 유용하며 비용-효과적인 방법으로 감염개체의 분류, 감염률(유병률) 추정, 질병 비발생 증명 등 다양한 목적으로 활용되고 있다(3,4,6-8,16,20,29,24). 특히 벡터모기에서 감염률 추정을 위한 합병검사에서는 분석 측면에서 MIR과 MLE 기법이 사용된다. MIR은 감염률이 매우 낮을 때 가장 적절히 사용할 수 있기 때문에 감염률이 높거나 시간이나 공간적으로 군집을 이루고 pooling size가 클 경우에는 감염률의 추정치가 왜곡될 수 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하는 대안으로 MLE 방법이 제시되었으며 고정형 pooling size(5,6,14,28)와 변동형 pooling size(3,4,10-13,30)에 대한 분석이 주로 사용된다.

합병검사에서는 표본선발과 표본을 pool에 할당할 때 통계적 무작위성 원칙을 사용하여 결과가 왜곡(bias)되지 않도록 하는 것이 중요하다. 이러한 합병검사는 감염률이 10-30% 이하로 낮을 때 장점이 최대가 되며(17,23) 일반적으로 감염률이 높을 경우에는 pooling size를 줄이고 pool의 개수를 증가시켜야 하기 때문에 합병검사의 장점이 감소한다. 즉 1개의 pool에 너무 많은 시료를 혼합하면 하나의 pool에 적어도 1개의 양성시료가 포함될 가능성이 100%에 근사해지



**Fig 1.** Maximum likelihood (ML) estimates of infection rate for different values of sensitivity (Se) and specificity (Sp) given equal pooling size. Infection rate was calculated using the ML for constant pooling size.

고, 반대로 너무 적은 수의 시료를 혼합하면 1개의 pool에 적어도 1개의 양성시료가 포함될 가능성이 0%에 근사해지므로 두 경우 모두 합병검사의 장점이 상쇄되는 것이다. 본 연구에서 pooling size가 클수록 (시나리오 A, E) MIR과 MLE에 의한 감염률 추정치의 차이가 매우 큰 것으로 나타났는데 이러한 결과는 감염률이 낮고 pooling size가 작을 경우 두 방법 간 큰 차이가 없으나 이러한 가정을 위반하는 상황에서는 큰 차이가 있다는 보고(11)와 일치하였다. 한편 본 연구에서 변동형 pooling size에 대한 시나리오(E-J)에 대하여 양성 pool이 검출된 pool의 위치가 다를 경우 감염률의 변화를 비교하기 위하여 각 시나리오에서 마지막 2개 pool에서 양성으로 확인된 것으로 가정하여 감염률을 계산하였다. 분석결과 시나리오 E 75.3 (95% CI, 30.0-183.6), 시나리오 F 40.2 (95% CI, 10.2-143.5), 시나리오 G 27.2 (95% CI, 7.8-72.7), 시나리오 H 28.2 (95% CI, 5.8-94.0), 시나리오 I 17.9 (95% CI, 4.2-51.7), 시나리오 J 9.8 (95% CI, 1.6-31.8)로 추정되어 Table 2에 제시한 결과에 비하여 다소 높았으나 감염률의 추이는 유사하게 나타났다.

합병검사에서 유도된 감염률은 실제 감염률 보다 대부분 높게 추정되는 문제가 있으며 이러한 왜곡의 정도는 높은 유병률, pool의 개수 감소, pooling size 증가, 총 표본크기 감소, 모든 pool에서 검사양성으로 나올 확률이 감소할수록 증가하는 것으로 알려져 있다(6,11,12,25,28). 따라서 추정치의 정확성과 신뢰성을 희생하지 않으면서 조사의 목적을 달성할 수 있는 최적 pool의 개수와 pooling size를 결정하는 것이 중요하여 이러한 목적으로 Bayesian 기법이나 모의시험을 이용한 연구결과가 보고되었다(9,15,19,24). 본 연구에서는 벡터 모기의 감염률 참값에 관한 자료가 없어 추정치에 영향을 미치는 요인들과 다양한 pooling size의 효과를 평가할 수 없었고, 합병시료에 대한 가상의 표본추출 강도를 가정하여 MI와 MLE법에 의한 감염률의 변화를 비교하였는데 향후 실제 검진자료가 확보된다면 두 방법 간 감염률 추정치의 정확성을 평가할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

관심을 두고 있는 질병의 감염률 (유병률)이 낮고 질병발생 양상이 시간과 공간적으로 균집을 이루지 않는 가정이 유효할 때 비용-효과적인 방법으로 감염률을 추정하는 대안으로 합병검사를 사용한다. 본 연구에서는 소의 모기매개질병에 대한 현행 혈청검사 계획의 개선안으로 벡터모기에서의 감염률을 추정할 때 합병검사에 대하여 MLE를 응용하는 방법을 제시하였다. 가상의 표본추출 시나리오에 대한 분석에서 감염률의 추정치에 영향을 미치는 요인으로 pooling size, pool의 개수, 진단검사의 민감도와 특이도의 효과를 평가하였다. 실제검진 자료에서 벡터모기의 감염률에 관한 자료를 확보하여 합병검사에 의한 추정치의 정확성을 평가하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2010년도 국립수의과학검역원 용역연구사업 (과제번호: Z-AD17-2009-09-01)과 강원대학교 동물의학종합연구소의 지원으로 수행되어 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 국립수의과학검역원. 2008년 가을채혈 소모기매개질병(5종) 혈청검사 결과보고. 2009.
2. Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel G, Dupuis AP, Ngo KA, Nicholas DC, Young DM, Shi PY, Kulasekera VL, Eidson M, White DJ, Stone WB, Kramer LD. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg Inf Dis* 2001; 7: 679-685.
3. Brookmeyer R. Analysis of multistage pooling studies of biological specimens ofr estimating disease incidence and prevalence. *Biometrics* 1999; 55: 608-612.
4. Chen CL, Swallow WH. Using group testing to estimate a proportion, and to test the binomial model. *Biometrics* 1990; 46: 1035-1046.
5. Chiang CL, Reeves WC. Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. *Am J Hyg* 1962; 75: 377-391.
6. Cowling DW, Gardner IA, Johnson WO. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. *Prev Vet Med* 1999; 39: 211-225.
7. Dorfman R. The detection of defective members of large populations. *Ann Math Stat* 1943; 14: 436-440.
8. Eamens GJ, Walker DM, Porter NS, Fell SA. Pooled faecal culture for the detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in goats. *Aust Vet J* 2007; 85: 243-251.
9. Enøe C, Georgiadis MP, Johnson WO. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev Vet Med* 2000; 45: 61-81.
10. Farrington CP. Estimating prevalence by group testing using generalized linear models. *Stat Med* 1992; 11: 1591-1597.
11. Gu W, Lampman R, Novak RJ. Problems in estimating mosquito infection rates using minimum infection rate. *J Med Entomol* 2003; 40: 595-596.
12. Gu W, Lampman R, Novak RJ. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 200-204.
13. Hepworth G. Exact confidence intervals for proportions estimated by group testing. *Biometrics* 1996; 52: 1134-1146.
14. Johansen CA, van den Hurk AF, Pyke AT, Zborowski P, Phillips DA. Entomological investigations of an outbreak of Japanese encephalitis virus in the Torres Strait, Australia, in 1998. *J Med Entomol* 2001; 38: 581-588.
15. Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol* 1995; 141: 263-272.
16. Kacena KA, Quinn SB, Howell MR, Madico GE, Quinn TC, Gaydos CA. Pooling urine samples for ligase chain reaction screening for genital Chlamydia trachomatis infection in asymptomatic women. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 481-485.

17. Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence surveys using pooled sera. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1449-1452.
18. Lord CC, Rutledge CR, Tabachnick WJ. Relationships between host viremia and vector susceptibility for arboviruses. *J Med Entomol* 2006; 43: 623-630.
19. Mendoza-Blanco JR, Tu XM, Lyengar S. Bayesian inference on prevalence using a missing-data approach with simulation-based techniques: applications to HIV screening. *Stat Med* 1996; 15: 2161-2176.
20. Muñoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, Hietala SK. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhea virus persistently infected cattle. *J Vet Diag Invest* 2000; 12: 195-203.
21. Olson KE, Adelman ZN, Travanty EA, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD. Development arbovirus resistance in mosquitoes. *Insect Bio Chem Mol Biol* 2002; 32: 1333-1343.
22. Reisen WK, Lundstrom JO, Scott TW, Eldridge BF, Chiles RE, Cusack R, Martinez VM, Lothrop HD, Gutierrez D, Wright SE, Boyce K, Hill BR. Patterns of avian seroprevalence to western equine encephalomyelitis and Saint Louis encephalitis viruses in California, USA. *J Med Entomol* 2000; 37: 507-527.
23. Sacks JM, Bolin SR, Crowder SV. Prevalence estimation from pooled samples. *Am J Vet Res* 1989; 50: 205-206.
24. Tavornpanich S, Muñoz-Zanzi CA, Wells SJ, Raizman EA, Carpenter TE, Johnson WO, Gardner IA. Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in midwestern US dairy herds. *Prev Vet Med* 2008; 83: 65-82.
25. Thompson KH. Estimation of the proportion of vectors in a natural population of insects. *Biometrics* 1962; 18: 569-578.
26. Thorburn MA. Apparent prevalence of fish pathogens in asymptomatic salmonid populations and its effect on misclassifying population infection status. *J Aquat Anim Health* 1996; 8: 271-277.
27. Tsuda T, Yoshida K, Ohashi S, Yanase T, Sueyoshi M, Kamimura S, Misumi K, Hamana K, Sakamoto H, Yamakawa M. Arthrogryposis, hydranencephaly and cerebellar hypoplasia syndrome in neonatal calves resulting from intrauterine infection with Aino virus. *Vet Res* 2004; 35: 531-538.
28. Tu XM, Litvak E, Pagano M. Studies of AIDS and HIV surveillance. Screening tests: can we get more by doing less? *Stat Med* 1994; 13: 1905-1919.
29. Van den Hurk AF, Nisbet DJ, Foley PN, Ritchie SA, Mackenzie JS, Beebe NW. Isolation of arboviruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected from the Gulf plains region of northwest Queensland, Australia. *J Med Entomol* 2002; 39: 786-792.
30. Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ. Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size. *Am J Epidemiol* 1980; 112: 124-128.
31. Weng M, Lien J, Ji D. Monitoring of Japanese Encephalitis virus infection in mosquitoes (Diptera: Culicidae) at Guandu Nature Park, Taipei, 2002-2004. *J Med Entomol* 2005; 42: 1085-1088.