

## 돼지생식기호흡기증후군(PRRS) 바이러스 감염 항체 검출 ELISA 상용 키트의 정확도 비교

박선일<sup>1</sup> · 이승환\* · 박경애\*\*

강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소, \*경기도 축산위생연구소, \*\*경기도 북부 축산위생연구소

### Comparison of Two Commercial Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus Infection

Son-Il Pak<sup>1</sup>, Seung-Hwan Lee\* and Kyung-Ae Park\*\*

College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

\*Gyeonggi Province Veterinary Service Center, Suwon 16381, Gyeonggi-do, Korea

\*\*Gyeonggi Province Northern Livestock & Veterinary Service, Namyangju 12035, Gyeonggi-do, Korea

(Received: February 20, 2016 / Accepted: April 14, 2016)

**Abstract :** More than 20 years after the first report of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea, the disease is still having major impact on domestic pig health and relevant industries. Although ELISA tests are commonly used by veterinarians to guide herd management, data on diagnostic performance of the test in field settings are very limited. The objective of this study was to evaluate two commercially available PRRSV ELISA (IDEXX PRRS X3 ELISA and Bionote PRRSV ELISA 4.0) to detect antibodies against PRRSV on serum samples. To this end, a total of 1,108 sera were recruited from 35 swine farms located in Gyeonggi province and tested at the Gyeonggi Province Veterinary Service Center. All tests were performed according to the manufacturer's instructions, by laboratory technicians who routinely perform PRRS testing on blood samples. Samples were collected from two sources of swine populations with different PRRS prevalence; 60 samples (5.4%) were originated from breeding farms and the remaining 1,048 samples (94.6%) were from farrow-to-finish farms. We applied Bayesian latent class model (LCM) for two-tests in the two-population when the accuracy of the gold standard is not available. The model estimated that Bionote ELISA was a bit more specific but slightly less sensitive. The estimated sensitivity and specificity of the IDEXX ELISA were 99.8% (95% CI 98.1-100%) and 86.4% (95% CI 81.4-96.5%), respectively. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for Bionote kit were 98.7% (95% CI 92.8-100%), 89.8% (95% CI 86.2-93.1%), 93.8% (95% CI 91.5-96.0%), and 97.8% (95% CI 87.1-100%), respectively. Based on the Bayesian 95% credible intervals, the sensitivity and specificity of the two ELISAs were not significantly different each other when assuming that two kits were imperfect, indicating that two kits performed equally well in terms of sensitivity and specificity in our field setting.

**Key words :** PRRS, ELISA, antibody, diagnostic performance, latent class model.

## 서 론

돼지생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)은 PRRS virus (PRRSV)에 의한 감염증으로 모돈의 불임과 임신후기 유산과 사산 등의 번식기계의 장애가 나타나며, 비육돈의 성장저하, 포유자돈과 이유자돈에서 간질성 폐렴 등의 호흡기 증상과 이유 후 폐사율이 증가하여 국내 양돈업계에 막대한 경제적 손실을 유발하는 소모성질병이다(10,11). 통계청의 농림수산물주요통계에 의하면 2014년 기준으로 우리나라의 농림업 총생산액은 47

조 2922억원이며, 이 중 축산업 생산액은 18조 7819억원으로 총 생산액의 39.5%를 차지하고 있다. 축산업 분야로 볼 때 돼지 6조 6천억원(13.9%), 한육우 4조 2천억원(9.0%), 닭·계란 3조 8천억원(8.1%), 우유 2조 3천억원(4.9%), 기타 1조 7천억원(3.6%)으로 돼지의 생산비중이 가장 높다. 가축 질병으로 인한 경제적 피해 규모는 생산시스템, 사육규모, 질병 발생상황 등에 따라 차이가 있지만 세계동물보건기구(OIE)에서는 전 세계적으로 축산물 생산액의 약 20%로 추정하고 있어(19) 이를 국내 상황에 적용해보면 가축질병으로 인한 경제적 피해 금액은 연간 약 1조원이 될 것으로 추산된다(22). PRRS 발생에 의한 경제적 피해는 우리나라의 경우 연간 최소 1,000억원으로 추정되어(22) 가축질병에 의한 연간 축산물 손실액의 약 10%를 차지하며, 미국의 경우 포

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

유돈과 육성-비육돈에서의 호흡기 질병에 기인하여 6억 달러 이상의 손실을 유발하는 것으로 보고되었다(17).

돈군에서 PRRS를 모니터링하기 위한 관리전략의 일환으로 흔히 혈청학적 검사를 수행하며, 1992년 간접 ELISA 기법이 처음으로 소개된 이후 PRRSV 항체검출을 위한 다양한 검사법이 개발되어 있다(1). 특히 ELISA 검사는 혈청 시료에서 PRRSV 특이 항체를 검출하는 방법으로 반복성(repeatability), 재현성(reproducibility) 및 특이도(specificity)가 높고, 신속한 결과판정, 저렴한 비용 등의 장점이 있어 널리 사용되고 있다. 현재 국내에서도 시판되고 있는 IDEXX PRRS X3 Antibody ELISA의 민감도와 특이도는 98.8%와 99.9%(PRRS ELISA package insert; IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine)로 매우 높아 항체검출을 위한 표준검사법으로 사용되고 있다(10,13,28).

가축질병 발생 상황을 지속적으로 감시하고 모니터링하기 위해서는 다양한 임상상황에서 진단검사(키트)의 정확도를 평가할 필요가 있다(14). 민감도와 특이도가 100%인 완벽한 표준검사법(gold standard)을 이용할 수 있다면 진단검사의 민감도와 특이도는 직접 추정할 수 있으나(32) 이러한 표준 검사법이 없거나 이용하지 못한 상황에서는 평가대상이 되는 검사의 정확도에 대한 불편 추정치(unbiased estimate)를 얻지 못한다(16). 이는 경쟁관계에 있는 진단검사의 상대적 특성을 평가함에 있어 완벽하지 않은 검사법을 표준검사로 사용하는 경우 평가대상 검사의 정확도가 왜곡된다는 것을 의미한다(23,29). 이를테면 민감도가 100%가 아닌 표준검사 A에서 위음성(false negative)으로 분류된 개체가 상대적으로 민감한 검사 B에서 양성으로 분류되는 경우 검사 B의 특이도가 낮게 추정되는 왜곡된 결과가 초래되기 때문에 완벽한 검사법을 사용하지 않은 경우에는 최대우도법(maximum likelihood)이나 Bayesian latent class model(LCM) 등과 같은 통계적 모형을 사용하여 추정해야 한다(12,18,21). 현재 시판되고 있는 대부분의 PRRSV 항체검출 키트는 완벽한 표준검사법이 아니기 때문에 본 연구에서는 PRRSV 항체검출 키트로 국내에서 널리 사용되고 있는 IDEXX ELISA와 Bionote ELISA의 정확도를 확률모형에 근거하여 비교·평가하고자 수행되었다.

**재료 및 방법**

**공시재료**

Bayesian LCM을 적용하기 위하여 2015년 9월부터 11월 까지 PRRSV 항체 유병률이 서로 다른 경기도 소재의 종돈장(breeding farm) 1개소 60두와 일관 사육농장(farrow-to-finish farm) 35개소 1,108두 등 총 1,108두(20-180일령 743두, 모돈 146두, 후보돈 219두)로부터 채혈하여 얻은 혈청을 공시재료로 사용하였다.

**항체검사**

PRRSV 항체검사를 위해 IDEXX PRRS X3 Antibody ELISA (IDEXX Laboratories, USA)와 Bionote PRRSV Antibody ELISA 4.0 (BioNote Inc., Korea)을 사용하였다. 흡착 플레이트는 검사 10분 전 개봉하여 각 제조사가 추천

하는 절차에 따라 검사를 진행하였으며, 두 kit 모두 양성과 음성 대조액으로 원액을 사용하였다. 실험과정을 간단히 요약하면 40배 희석된 혈청과 음성 및 양성 대조액을 PRRSV 흡착 플레이트에 분주하여 실온에서 30분 반응 시킨 후 흡착 플레이트의 검체와 대조액을 제거하였다. 세척액으로 플레이트를 5회 세척한 후 conjugate를 100 µl 분주하여 실온에서 30분 반응시킨 후 세척액으로 5회 세척하였다. 기질액(TMB, 100 µl)을 분주하여 실온의 암실에서 15분간 반응시킨 후 정지액(100 µl)을 분주하였다. IDEXX ELISA와 Bionote ELISA의 결과는 각각 650 nm와 450 nm의 흡광도에서 측정하였으며, 두 제품 모두 sample-to-positive (S/P) ratio가 0.4 이상일 때 양성, 0.4 미만일 때 음성으로 판정하였다.

**통계분석**

본 연구에서는 양돈장의 PRRS 감염 여부에 대한 확진검

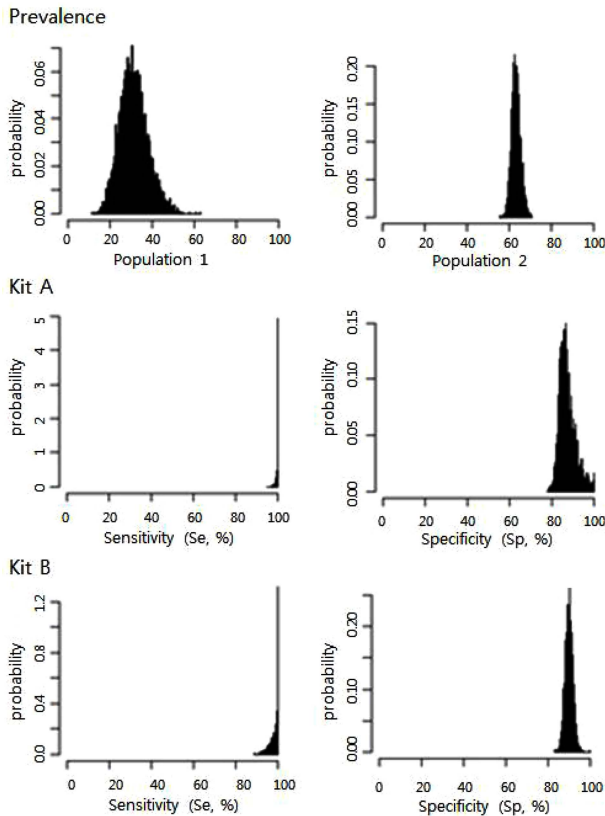
**Table 1.** Patterns of diagnostic test results of IDEXX X3 antibody ELISA and Bionote antibody ELISA 4.0 for detecting porcine reproductive respiratory syndrome virus

Pattern	Test result		Frequency	
	IDEXX	Bionote	Breeding farm	Farrow-to-finish farm
1	+	+	18	652
2	+	-	7	56
3	-	+	13	27
4	-	-	22	313
Total			60	1,048

**Table 2.** Median statistics of IDEXX X3 antibody ELISA and Bionote antibody ELISA 4.0 for detecting PRRSV estimated by using the Bayesian latent class model (LCM) and conventional method

Parameter	Bayesian LCM (95% CI)	Conventional method (95% CI)
<b>Prevalence (%)</b>		
Breeding farm	30.6 (19.3-45.3)	41.7 (29.3-55.1)
Farrow-to-finish farm	63.0 (59.3-67.5)	67.6 (64.6-70.4)
<b>IDEXX ELISA</b>		
Sensitivity (%)	99.8 (98.1-100.0)	100.0
Specificity (%)	86.4 (81.4-96.5)	100.0
Positive predictive value (%)	92.0 (88.7-98.1)	100.0
Negative predictive value (%)	99.6 (96.5-100.0)	100.0
<b>Bionote ELISA</b>		
Sensitivity (%)	98.7 (92.8-100.0)	91.4 (89.1-93.3)
Specificity (%)	89.8 (86.2-93.1)	89.3 (85.7-92.2)
Positive predictive value (%)	93.8 (91.5-96.0)	94.4 (92.3-95.9)
Negative predictive value (%)	97.8 (87.1-100.0)	84.2 (80.1-87.5)

\*Conventional method assumed that IDEXX kit is perfect with 100% sensitivity and 100% specificity. CI, confidence interval.



**Fig 1.** Prevalence, sensitivity, and specificity of IDEXX X3 antibody ELISA (kit A) and Bionote antibody ELISA 4.0 (kit B) for detection of porcine reproductive respiratory syndrome virus infection among two populations by using Bayesian latent class model.

사를 적용하지 않았기 때문에 두 ELISA 키트의 민감도와 특이도가 100%가 아니라는 점을 고려하여 웹 기반에서 수행되는 Bayesian LCM 프로그램을 사용하여 민감도와 특이도를 추정하였다(23).

## 결 과

본 연구에 사용된 1,108건(종돈장 60건, 일반 양돈장 1,048건)의 혈청에 대하여 ELISA 검사를 시행한 결과를 분류하면 Table 1과 같다. 두 키트에서 모두 양성 반응을 보인 시료는 670건, 두 키트 모두 음성 335건, 두 키트 간에 결과가 일치하지 않는 시료는 103건이었다. Bayesian LCM으로 분석한 결과 민감도와 특이도는 IDEXX ELISA의 경우 99.8%(98.1-100.0%)와 86.4%(81.4-96.5%)였으며, Bionote ELISA는 98.7%(92.8-100.0%)와 89.8%(86.2-93.1%)로 분석되었으며, 두 진단키트의 민감도와 특이도는 95% 신뢰수준에서 차이가 없었다(Table 2, Fig 1).

## 고 찰

본 연구에서 적용한 Bayesian LCM은 검사결과의 모든 가능한 조합에 대한 관찰된 빈도에 근거하여 유병률과 정확도를 추정하는 통계적 기법으로, Joseph 등(21)은 진단검사의 특성을 평가하는 방법으로 단일 집단에 2종의 검사를 적

용한 모형(two-test one-population model)을 처음으로 제안하였다. Hui와 Walter(18)는 정확도를 알지 못하는 두 진단검사를 두 집단에 적용하는 모형(two population model)에서 민감도, 특이도 및 유병률을 추정하는 모형을 제시하였으며, 이 모형은 첫째, 유병률이 서로 다른 두 집단에 대하여 검사를 각각 적용하고 둘째, 민감도와 특이도는 두 집단에서 일정하며 셋째, 검사결과는 질병상태의 참값에 대하여 조건부 독립(conditionally independent)이라는 가정을 충족할 때 사용할 수 있다(2,20,23,31). 완벽하지 못한 검사를 사용한 경우 진단검사의 특성은 latent class model로 평가할 수 있으며(18), 여기에서 잠재변수(latent)는 각 시료의 감염상태에 대한 참값이 알려져 있지 않아 실제로 관찰된 자료에서 추정되어야 하는 변수를 의미한다. Bayesian LCM 기법은 구제역(3,8), 요네병(9,32), 땀귀열(27), 말라리아(30), 랩토스피라(24), 전염성언어빈혈(4) 등 다양한 진단검사 분야에서 널리 사용되고 있다.

확률모형에 근거하여 ELISA의 특성을 평가한 결과 제조사에서 제시한 민감도와 특이도(IDEXX X3 ELISA 98.8%와 99.9%, Bionote ELISA 98.7%와 99.7%)와 비교할 때 두 제품의 민감도는 98.7-99.8%(Table 2)로 나타나 실험적 감염실험에서 100%를 보고한 선행 연구결과(28)와 거의 일치하는 반면에 두 제품의 특이도는 86.4-89.8%로 다소 낮게 추정되었는데 이에 대해서는 일부 추론적 해석이 가능하다. 첫째, 연구 대상 지역에서 유행하고 있는 바이러스의 유전형이 다를 수 있다는 점이다. 유전형(genotype)으로 볼 때 PRRSV는 유럽형(type 1, European prototype strain Lelystad)과 북미형(type 2, North American prototype strain VR-2332)의 2종으로 분류되며, 두 유전자형은 약 60%의 염기상동성(nucleotide sequence homology)을 보이지만 각각의 유전형은 매우 다른 다양한 아형(subgenotype)으로 구성되어 있다(15). 이러한 아형의 일부는 중증의 이환율과 폐사율을 동반하는 열성 질환(high fever disease)을 초래하여 새로운 계열의 고병원성 type 2 PRRSV로 아시아에 광범위하게 확산되어 있으며 미국에서도 보고된바 있다(15). 진단검사의 특성을 평가한 연구들이 상이한 결과를 보이는 사례는 매우 흔한데 그 이유는 바이러스의 유전형과 같은 병원체의 특성, 감염용량, 질병의 진행경과, 임상증상 발현 정도 등 연구 대상 집단의 차이를 비롯하여 선택성 편견(selection bias), 방법론적 혹은 기술적인 차이 등 복합적인 요인이 관여하기 때문이다(5,7,14). 본 연구에서도 검체가 수집된 지역적 혹은 연구대상 집단의 차이에 기인하여 특이도가 낮게 추정되었을 가능성이 있다. 둘째, ELISA 키트는 간편성과 신속성의 장점으로 널리 사용되고 있지만 특히 IDEXX의 초기 제품인 HerdChek 2XR을 사용할 때 위양성(false positive) 결과가 발생하는 문제점이 보고된바 있으며(10,26), 위양성률은 약 1%이지만 연구자에 따라 2.2-7% 수준까지 보고되어 혈청 시료에서 PRRSV의 참값을 판정하는데 ELISA 검사법의 한계가 있음을 의미한다(6,25,26). 본 연구에서 사용한 IDEXX X3 ELISA의 위양성률이 개선되지 않았다면 특이도는 여전히 낮게 추정될 가능성을 배제할 수 없으며, 이는 Bionote 제품에 대해서도 동일한 해석이 가능하다.

PRRS를 성공적으로 관리하기 위해서는 감염된 개체와 돈

군을 정확하고 비용-효과적이며 신속하게 검출할 수 있는 모니터링 프로그램을 구축해야 한다. 최근의 연구에 의하면 PCR 검사에서 위음성(false-negative) 결과가 발생하는 사례가 보고되고 있어(13) 감염 초기단계에서 PRRS 진단능력을 향상시키기 위해서는 다양한 검사법을 병용하는 것이 바람직함을 시사한다. 이러한 측면에서 민감도 역시 진단검사의 중요한 특성인데 민감도는 질병상태(임상형 혹은 준임상형), 병변의 중증도, 감염용량, 감염 후 경과시간 등 다양한 요인에 영향을 받기 때문에 만일 이러한 요인들이 연구대상 집단 간 혹은 집단 내의 하부 집단(sub-population)에서 매우 다르다면 민감도 추정치는 개체 수준에서의 표본추출 방법에 따라 상당한 차이를 보이게 된다. 엄격한 의미에서 진단검사의 민감도와 특이도는 주어진 참고집단에 대한 검사의 성능을 요약하는 수단이므로(14) 전술한 이질성에 기여하는 요인들을 정량화하지 못한다면 특정 연구 집단을 대상으로 얻은 결과를 일반화하기 어렵다. 또한 본 연구의 혈청 검체는 일정기간 동안 진단용으로 의뢰된 시료만을 대상으로 하는 비확률적으로 수집된 축차표본(sequential sampling)이라는 점을 고려할 때 진단검사의 정확도에 영향을 미치는 다양한 요인을 고려한 광범위한 역학적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구는 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV) 항체를 검출하는데 흔히 사용되고 있는 상업용 진단키트인 IDEXX PRRS X3 Antibody ELISA (IDEXX Laboratories, USA)와 Bionote PRRSV ELISA 4.0 (BioNote Inc, Korea)의 민감도와 특이도를 비교하고자 수행되었다. 종돈장 60두와 일관 사육농장 1,048두에서 채혈한 총 1,108두의 혈청 시료에 대하여 ELISA 검사를 각각 시행한 결과 1,005건은 두 키트 간 검사결과가 일치하였으나 103건은 일치하지 않은 것으로 나타났다. 검사결과에 대하여 Bayesian latent class model을 이용하여 분석한 결과 민감도와 특이도는 IDEXX ELISA의 경우 99.8%(98.1-100.0%)와 86.4%(81.4-96.5%), Bionote ELISA는 98.7%(92.8-100.0%)와 89.8%(86.2-93.1%)로 분석되었으며, 95% 신뢰수준에서 두 ELISA 키트의 민감도와 특이도는 통계적으로 차이가 없었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 가축질병대응기술개발사업 (Animal Disease Management Technology Development, 과제번호: C1012360-01-01)으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Albina E, Leforban Y, Baron T, Plana Duran JP, Vannier P. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech Vet* 1992; 23: 167-176.
- Branscum AJ, Gardner IA, Johnson WO. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev Vet Med* 2005; 68: 145-163.
- Bronsvort BM, Toft N, Bergmann IE, Sørensen KJ, Anderson J, Malirat V, Tanya VN, Morgan KL. Evaluation of three 3ABC ELISAs for foot-and-mouth disease non-structural antibodies using latent class analysis. *BMC Vet Res* 2006; 2: 30.
- Caraguel C, Stryhn H, Gagné N, Dohoo I, Hammell L. Use of a third class in latent class modelling for the diagnostic evaluation of five infectious salmon anaemia virus detection tests. *Prev Vet Med* 2012; 104: 165-173.
- Chan MC, Lee N, Ngai KL, Leung TF, Chan PK. Clinical and virologic factors associated with reduced sensitivity of rapid influenza diagnostic tests in hospitalized elderly patients and young children. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 497-501.
- Dee SA, Bierk MD, Deen J, Molitor TW. An evaluation of test and removal for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 5 swine farms. *Can J Vet Res* 2001; 65: 22-27.
- Detrano R, Janosi A, Lyons KP, Marcondes G, Abbassi N, Froelicher VF. Factors affecting sensitivity and specificity of a diagnostic test: the exercise thallium scintigram. *Am J Med* 1988; 84: 699-710.
- Engel B, Buist W, Orsel K, Dekker A, de Clercq K, Grazioli S, van Roermund H. A Bayesian evaluation of six diagnostic tests for foot-and-mouth disease for vaccinated and non-vaccinated cattle. *Prev Vet Med* 2008; 86: 124-138.
- Espejo LA, Zagmutt FJ, Groenendaal H, Muñoz-Zanzi C, Wells SJ. Evaluation of performance of bacterial culture of feces and serum ELISA across stages of Johne's disease in cattle using a Bayesian latent class model. *J Dairy Sci* 2015; 98: 8227-8239.
- Ferrin NH, Fang Y, Johnson CR, Murtaugh MP, Polson DD, Torremorell M, Gramer ML, Nelson EA. Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 503-514.
- Frossard JP, Hughes GJ, Westcott DG, Naidu B, Williamson S, Woodger NG, Steinbach F, Drew TW. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: genetic diversity of recent British isolates. *Vet Microbiol* 2013; 162: 507-518.
- Gardner IA. The utility of Bayes' theorem and Bayesian inference in veterinary clinical practice and research. *Aust Vet J* 2002; 80: 758-761.
- Gerber PF, Giménez-Lirola LG, Halbur PG, Zhou L, Meng XJ, Opriessnig T. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and fluorescent microbead immunoassays for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *J Virol Methods* 2014; 197: 63-66.
- Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000; 45: 3-22.
- Guo B, Lager KM, Schlink SN, Kehrl ME Jr, Brockmeier SL, Miller LC, Swenson SL, Faaberg KS. Chinese and Vietnamese strains of HP-PRRSV cause different pathogenic outcomes in United States high health swine. *Virology* 2013; 446: 238-250.
- Hartnack S, Budke CM, Craig PS, Jiamin Q, Boufana B, Campos-Ponce M, Torgerson PR. Latent-class methods to evaluate diagnostics tests for Echinococcus infections in dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2068.
- Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rottorf HF, Yoder TK, Wang C, Yeske PE, Mowrer CL, Haley CA. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States

- pork producers. *J Swine Health Prod* 2013; 21: 72-84.
18. Hui SL, Walter SD. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*. 1980; 36: 167-171.
  19. IFC. Good Practice Note: Improving Animal Welfare in Livestock Operations. International Finance Corporation. World Bank Group, 2014.
  20. Johnson WO, Gardner IA, Metoyer CN, Branscum AJ. On the interpretation of test sensitivity in the two-test two-population problem: assumptions matter. *Prev Vet Med* 2009; 91: 116-121.
  21. 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.
  22. Kim KW, Pak SI. An epidemiological study on biosecurity practices on commercial pig farms in Korea: risk factors for porcine reproductive respiratory syndrome virus infection. *J Vet Clin* 2015; 32: 78-84.
  23. Lim C, Wannapinij P, White L, Day NP, Cooper BS, Peacock SJ, Limmathurotsakul D. Using a web-based application to define the accuracy of diagnostic tests when the gold standard is imperfect. *PLoS One* 2013; 8: e79489.
  24. Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, Chierakul W, Smythe LD, Day NP, Cooper B, Peacock SJ. Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 322-331.
  25. Mortensen S, Strandbygaard B, Bøtner A, Feld N, Willeberg P. Monitoring porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection status in swine herds based on analysis of antibodies in meat juice samples. *Vet Res* 2001; 32: 441-453.
  26. Okinaga T, Yamagishi T, Yoshii M, Suzuki T, Miyazaki A, Takagi M, Tsunemitsu H. Evaluation of unexpected positive results from a commercial ELISA for antibodies to PRRSV. *Vet Rec* 2009; 164: 455-459.
  27. Pan-ngum W, Blacksell SD, Lubell Y, Pukrittayakamee S, Bailey MS, de Silva HJ, Lalloo DG, Day NP, White LJ, Limmathurotsakul D. Estimating the true accuracy of diagnostic tests for dengue infection using bayesian latent class models. *PLoS One* 2013; 8: e50765.
  28. Seo BJ, Kim H, Cho HS, Park BY, Kim WI. Evaluation of two commercial PRRSV antibody ELISA kits with samples of known status and singleton reactors. *J Vet Med Sci* 2016; 78: 133-138.
  29. Seuberlich T, Tratschin JD, Thür B, Hofmann MA. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1183-1191.
  30. Speybroeck N, Praet N, Claes F, Van Hong N, Torres K, Mao S, Van den Eede P, Thi Thinh T, Gamboa D, Sochantha T, Thang ND, Coosemans M, Büscher P, D'Alessandro U, Berkvens D, Erhart A. True versus apparent malaria infection prevalence: the contribution of a Bayesian approach. *PLoS One* 2011; 6: e16705.
  31. Toft N, Jørgensen E, Højsgaard S. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev Vet Med* 2005; 68: 19-33.
  32. van Schaik G, Haro F, Mella A, Kruze J. Bayesian analysis to validate a commercial ELISA to detect paratuberculosis in dairy herds of southern Chile. *Prev Vet Med* 2007; 79: 59-69.