

구제역 관리를 위한 혈청학적 예찰계획 평가

박선일¹ · 신연경*

강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소, *농림축산검역본부

(게재승인: 2013년 8월 10일)

Evaluation of Serological Surveillance System for Improving Foot-and-Mouth Disease Control

Son-Il Pak¹ and Yeun-Kyung Shin*

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

*Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-824, Korea

Abstract : The primary goal of this study was to compute sample sizes required to achieve the each aim of a variety of foot-and-mouth disease (FMD) surveillance programs, using a statistically valid technique that takes the following factors into account: sensitivity (Se) and specificity (Sp) of diagnostic test system, desired minimum detectable prevalence, precision, population size, and desired power of the survey. In addition, sample sizes to detect FMD if the disease is present and also as proof of freedom were computed. The current FMD active surveillance programs consist of clinical, virological, and serological surveillance. For the 2012 serological surveillance, annual sample sizes ($n = 265,065$) are planned at four separate levels: statistical ($n = 60,884$) and targeted ($n = 115,232$) at breeding pig farms and slaughter house, in together with the detection of structural proteins (SP) antibodies against FMD ($n = 88,949$). Overall, the sample size was not designed taking the specific aims of each surveillance stream into account. The sample sizes for statistical surveillance, assuming stratified two-stage sampling technique, was based to detect at least one FMD-infected case in the general population. The resulting sample size can be used to obtain evidence of freedom from FMD infection, not for detecting animals that have antibodies against FMD virus non-structural proteins (NSP). Additionally, sample sizes for targeted surveillance were not aimed for the population at risk, and also without consideration of statistical point of view. To at least the author's knowledge, sampling plan for targeted, breeding pig farms and slaughter house is not necessary and need to be included in the part of statistical surveillance. Assuming design prevalence of 10% in an infinite population, a total of 29 animals are required to detect at least one positive with probability of 95%, using perfect diagnostic test system ($Se = Sp = 100\%$). A total of 57,211 animals needed to be sampled to give 95% confidence of estimating SP prevalence of 80% at the individual animal-level with a precision of $\pm 5\%$, assuming 800 herds with an average 200 heads per farm, within-farm variance of 0.2, between-farm variance of 0.05, cost ratio of 100:1 of farm against animals. Furthermore, 779,736 animals were required to demonstrate FMD freedom, and the sample size can further be reduced depending on the parameters assumed.

Key words : foot-and-mouth disease, sample size, surveillance.

서 론

구제역(foot-and-mouth disease, FMD)은 전염성이 매우 높고 70종 이상의 우제류 동물에 치명적인 바이러스성 질병이다(4). 현재까지 O, A, C, Asia 1, SAT1, SAT2, SAT3 등 7개의 혈청형이 보고되어 있으며, 혈청형 간 유전적 지리적 분포에 차이를 보이고 임상적으로 감별할 수 없다(5,6,11). 2000년 이후 국내에서 발생한 5건의 사례에서 O형 4건과 A

형 1건 (2010년 포천)이 확인된바 있다(1,13). 소, 돼지, 양, 염소 등이 감수성을 보이며, 감염된 동물의 임상증상은 혈청형이나 축종에 따라 다양하다. 구제역에 감염될 경우 생산성이 감소하고, 사회경제적 손실이 크며 발생국에서 유래한 동·축산물의 국제교역이 금지되기 때문에 대부분의 국가에서는 구제역 청정상태를 유지하기 위하여 발생 이후 살처분, 이동 제한, 혈청역학조사, 백신접종 등 엄격한 방역조치를 사용하고 있다. 세계동물보건기구(world organization for animal health, OIE)에서는 2013년 5월 기준으로 구제역 발생에 대하여 백신 접종 청정국 (1개국), 백신 비접종 청정국 (66개국), 백신 접종 청정지대 (6개국), 백신 비접종 청정지대 (10

¹Corresponding author.
E-mail : paksi@kangwon.ac.kr

개국) 등 4개의 지위로 구분하고 있다.

우리나라의 경우 2010년 11월 경북 안동에서 O형 혈청형의 구제역이 최초로 발생한 이후 2011년 4월 까지 제주도, 전라남도, 전라북도를 제외한 74개 시군구의 3,748개 농장에서 발생하여 소, 돼지 등 우제류 약 340만두를 살처분하였으며, 확산을 차단하기 위하여 전국 규모의 백신접종 정책을 사용하였다(1,13). 구제역 발생 이후 청정지위를 확보하기 위해서는 과거 2년간 비발생, 최근 12개월간 바이러스 감염 혹은 순환 부재, 예방접종 축종에서 방어면역 80% 이상 등 OIE 권고사항을 충족해야 한다. 이러한 국제적 요구조건을 달성하기 위하여 정부에서는 2014년 5월 인증신청을 목표로 구제역 혈청학적 예찰계획(surveillance program)을 수립하여 이행하고 있다. 혈청학적 예찰 프로그램에 필요한 표본크기는 해당 모집단에서 감염된 개체를 검출할 확률에 결정적인 영향을 미친다. 즉 표본크기가 너무 적으면 극단적인 상황에서는 전두수를 검사한다고 하더라도 감염된 개체를 검출하는데 실패할 가능성이 높고, 반대로 표본크기가 매우 크면 낮은 수준의 유병률에서도 감염된 개체를 검출할 가능성이 증가하는 반면에 비용이 증가하여 비효율적인 프로그램이 된다. 본 연구에서는 농림축산부의 2012년 구제역 예찰 프로그램에서 계획하고 있는 검진두수의 적절성을 평가하고자 진단검사의 민감도와 특이도, 최소 검출유병률, 신뢰수준, 정밀도 등을 고려한 국내 돈군의 구제역 혈청학적 예찰 프로그램의 목적을 달성하는데 통계학적으로 유효한 표본크기를 산정한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

가축사육 현황

국내 돼지 사육현황 자료는 가축위생방역지원본부의 협조를 받아 검역본부의 위기대응센터로부터 관련 자료를 제공 받았으며, 구제역 혈청검사 성적은 농림축산검역본부에서 제공하였다.

표본크기

항체양성을 추정

표본크기가 충분히 클 때 비율(p)의 신뢰구간은 $p \pm z_{1-\alpha/2} \times SE(p)$ 이므로 오차한계 (기대정밀도, $\pm d$)가 적어도 d 보다 작다면 표본크기는 $n \geq z_c^2 pq / d^2$ 가 된다. 이 공식은 무한모집단에서 유병률에 대한 오차한계와 완벽한 진단검사를 가정한 것이며, 이항분포에 대한 정규 근사성을 가정하기 때문에 유병률이 $0.2 < p < 0.8$ 일 때 적절하게 사용할 수 있다. 진단검사가 완벽하지 않으면 $n = [z_{1-\alpha/2} / d(Se + Sp - 1)]^2 p(1-p)$ 로 계산되며, 여기에서 p = 유병률 추정치, Se = 민감도, Sp = 특이도이다(8). 백신 접종 모집단에서 방어 면역(structural protein, SP)이 일정 수준 이상이 유지되는지 확인하기 위한 2단계 유병률 조사의 표본크기를 계산하기 위하여 개별동물 선발에 대한 축군 선발에 소요되는 비용의 비(ratio) 100:1, 축군 간 분산 0.05, 축군 내 분산 0.2를 가정하여 Survey

Toolbox 패키지로 계산하였다(4).

감염개체 검출

질병검출은 적어도 1두의 감염된 개체(non-structural protein, NSP)를 검출하는데 필요한 표본크기를 계산하여 이들을 대상으로 검사한 결과 전 두수 음성일 때 질병 비발생이라는 결론을 유도하거나 모집단에서 유병률에 대한 정보가 전혀 없을 때 이를 추정하는 목적으로 사용된다(3). 모집단에서 유병률의 참값을 p 라고 할 때, n 두 모두 감염되어 있지 않을 확률은 $(1-p)^n$ 이 된다. 따라서 양성개체가 x 두일 확률은 이항분포를 따르므로 다음과 같이 계산된다.

$$P(T+=x) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x}$$

여기에서 p 는 검사결과로 얻는 현성유병률(AP^+)로 $AP^+ = p * Se + (1-p)(1-Sp)$ 이며, 진단검사가 완벽한 경우 $AP^+ = p$ 가 된다. 비발생 증명에서 적어도 1두의 감염개체를 검출하는 것은 해당 집단을 감염군이나 비감염군으로 판정하기 위함이다. 특이도가 완벽하지 않은 검사를 사용하는 경우 해당 집단을 양성으로 판정하기 위해서는 1두 이상의 양성개체 검출을 필요로 하지만, 특이도가 100%이라면 1두의 양성개체가 검출하는 것만으로도 양성으로 판정하는데 충분하다. 상기 공식에서 진단검사가 완벽하다고 가정할 때 질병 비발생을 증명하기 위한 판정조건으로 전두수 음성으로 지정하는 경우 $x=0$ 이 되므로 상기 식은 $P(T+=0) = (1-p)^n$ 가 된다. 따라서 유병률이 p 인 모집단에서 n 두의 표본을 선발하여 검사할 때 적어도 1두의 감염개체를 검출할 수 있는 신뢰수준(C)을 달성하기 위한 표본크기는 $n = \log(1-C) / \log(1-p)$ 로 계산된다.

청정증명

구제역 진단검사(NSP ELISA)의 민감도와 특이도, 개체 간 및 돈군 간 유병률, 돈군 수준에서의 민감도와 특이도, 허용오차, 제1형 오류(type I error), 제2형 오류율(type II error), 신뢰수준, 돈군크기, 최소 기대유병률 등을 고려하여 2단계표본추출법(2-stage sampling)에 의한 구제역 비발생 증명에 필요한 표본크기는 Survey Toolbox 패키지를 사용하였다(4). 계산을 위하여 농장(herd) 수준의 민감도(HSe)와 특이도(HSp)를 각각 99%, 돈군 간 유병률(BHP) 2%, 농장 수준의 제1형 오류(herd-level type I error)와 제2형 오류(herd-level type II error)를 각각 0.05, 개체 수준에서 NSP ELISA의 민감도(Se) 95%, 특이도(Sp) 99.5%, 돈군 내 유병률(WHP) 5%를 가정하였다(2).

결 과

농림축산부의 2012년 구제역 혈청검사 계획에서는 감염축(NSP 항체)을 조기에 검색하기 위하여 혈청검사 두수를 확대하고, 전국적인 상시 백신 접종이 시행됨에 따라 기존의

Table 1. The 2012 serological surveillance plan for foot-and-mouth disease (FMD) in Korea

	NSP test			SP test
	Statistical	Targeted	Breeder	
Purpose	To maintain FMD free status	Farm at high risk of being infected with FMD	Further evidence on FMD free status	To investigate the protective immunity in vaccinated populations
Sampling	2-stage stratified BHP: 1%	SRS	SRS	SRS
Parameter	WHP: cattle 10%, goat & pig 20%, Confidence 99%	-	-	-
Sample size	60,884	83,016	32,216	88,949
Test system	NSP ELISA	NSP ELISA	NSP ELISA	Type O SP ELISA

BHP = between-herd prevalence, WHP = within-herd prevalence, NSP = non-structural protein, SP = structural protein, SRS = simple random sampling

Table 2. Sample sizes required to detect at least one FMD-infected animals by confidence level and expected prevalence (sensitivity = 100%)

WHP (%)	Confidence level			WHP (%)	Confidence level		
	90%	95%	99%		90%	95%	99%
1	230	299	459	30	7	9	13
2	114	149	228	35	6	7	11
5	45	59	90	40	5	6	10
10	22	29	44	45	4	6	8
15	15	19	29	50	4	5	7
20	11	14	21	55	3	4	6
25	9	11	17	60	3	4	6

WHP = within-herd prevalence

통계예찰 (60,884두)과 목적예찰 (115,232두) 검사에 농가의 백신 실시 여부를 확인하기 위한 SP 항체검사 (88,949두)를 추가하여 총 265,065두 검사를 계획하고 있다(Table 1). 이러한 검사계획은 2011년 192,492두 (NSP 항체 검출 161,292두, SP항체 검출 31,200두)와 비교할 때 약 38% 증가한 수준이다. 무한모집단과 진단검사의 특성이 완벽하다는 가정에서 적어도 1두의 감염된 개체를 검출하는 것을 95% 신뢰하기 위해서는 무한모집단에서 약 29두를 검사해야 한다(Table 2). 민감도와 특이도가 완벽하지 않을 때 항체양성률을 ±10%의 정밀도로 추정할 때 지정한 신뢰수준을 달성할 수 있는 유한모집단 비보정 표본크기는 Table 3과 같다. 항체 유행률 조사를 위하여 2단계표본추출법에 필요한 표본크기는 국내 돼지 사육두수에 적용한 결과 총 57,211두로 계산되었다(Table 4). 구제역 청정증명을 위한 1단계 표본크기 (돈군 수)는 예를 들어 1,549개 돈군을 보유한 경기도의 경우 제1, 2형 오류 5%에서 HSe = HSp 99%를 충족하기 위해서는 총 462개 돈군과 2단계 표본크기 (돈군 당 선발 두수)는 205두를 선발해야 하는 것으로 계산되었다(Table 5). 전술한 결과를 종합하면 청정증명에 필요한 총 검사두수는 779,736두로

Table 3. Sample sizes required to expected seroprevalence (P) by confidence level and expected prevalence (precision = 10%)

P (%)	Se = Sp = 100%			Se = 90%, Sp = 100%		
	Confidence level			Confidence level		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
1	3	4	7	3	5	8
2	6	8	14	6	9	15
5	13	19	32	15	21	36
10	25	35	60	28	39	68
15	35	49	85	40	56	96
20	44	62	107	50	71	121
25	51	73	125	59	83	143
30	57	81	140	66	94	162
35	62	88	151	73	103	177
40	65	93	160	77	110	189

Se = sensitivity; Sp = specificity

계산되었다.

고 찰

구제역 예찰(FMD surveillance)은 구제역 발생 혹은 비발생 상황을 증명하기 위하여 이와 관련된 자료를 지속적으로 수집하고 분석함으로써 조기검출과 확산방지 등 구제역에 효과적으로 대응할 수 있는 일련의 방역조치를 개발하는 과정이라 할 수 있다. 효과적인 예찰시스템이 구축되기 위해서는 구제역 의심사례가 발견되는 즉시 보고가 이루어지며, 의심 사례에 대해서는 국제기준에 적합한 신뢰도가 높은 검사법을 사용하여 신속한 실험실 검사가 이루어져야 한다. 이러한 구제역 예찰활동과 관련하여 OIE 육상동물위생규약(Terrestrial Animal Health Code, 2012)에서는 세 가지 범주로 구분하고 있다. 임상예찰(clinical surveillance)은 의심축의 임상진단을 통해 감염여부를 파악하는 것으로서 임상증상을 보이는

Table 4. Sample sizes required to detect expected seroprevalence of 80%, using two-stage prevalence study¹⁾

Province	No. of labs ²⁾	Sample size		
		No. herds	No. animals within herd	Total
Kyonggi	5	77 × 5	20 × 5	1,540 × 5 = 7,700
Kangwon	Central	77	20	1,540
	Dongbu	77	21	1,617
	Nambu	77	20	1,540
	Chungbu	77	21	1,617
	Pukbu	77	21	1,617
	Sub-total	385	103	7,931
Chungbuk	4	77 × 4	20 × 4	1,540 × 4 = 6,160
Chungnam	6	77 × 6	20 × 6	1,540 × 6 = 9,240
Jeonbuk	5	77 × 5	20 × 5	1,540 × 5 = 7,700
Jeonnam	3	77 × 3	20 × 3	1,540 × 3 = 4,620
Kyongbuk	4	77 × 4	20 × 4	1,540 × 4 = 6,160
Kyongnam	4	77 × 4	20 × 4	1,540 × 4 = 6,160
Jeju	1	77	20	1,540
Total		2,849	744	57,211

¹⁾Assumption: precision ± 5%, confidence 95%, within-herd variance 0.2, between-herd variance 0.05, cost ratio of district-to-herd 100:1

²⁾Branch represents veterinary service laboratory of each province

Table 5. Sample sizes for demonstrating freedom from foot-and-mouth disease

Province	No. of herds	Average no. of animals within herd	Sample size		
			No. herds	No. animals within herd	Total
Kyonggi	1,549	1,131	462	205	94,710
Kangwon	429	917	325	204	66,300
Chungbuk	533	1,169	375	209	78,375
Chungnam	1,807	1,412	467	208	97,136
Jeonbuk	1,197	1,116	455	206	93,730
Jeonnam	1,115	866	457	205	93,685
Kyongbuk	1,402	938	460	204	93,840
Kyongnam	1,171	1,082	460	206	94,760
Jeju	352	1,617	320	210	67,200
Total	9,555		3,781	1,857	779,736

¹⁾Assumption: confidence 95%, BHP 2%, Type I & Type II error 5%, HSe = HSp = 99%, Se 95%, Sp 99.5%, WHP 5%

BHP = between-herd prevalence, HSe = sensitivity at herd-level, HSp = specificity at herd-level, Se = sensitivity at animal-level, Sp = specificity at animal-level, WHP = within-herd prevalence

개체에 대해 실험실 검사를 실시하거나, 대규모 혈청검사에서 양성반응을 보인 개체에 대해 정밀 임상진단을 실시하게 된다. 바이러스예찰(virological surveillance)은 구제역 바이러스 자체를 검출하는 것으로, 구제역 감염위험군의 항원검출 여부를 지속적으로 모니터링하거나 임상증상을 보이는 개체 혹은 양성개체에 대한 확진을 목적으로 시행된다. 혈청학적 예찰(serological surveillance)은 구제역 바이러스에 대한 항체를 검출하는 과정이다. 항체는 자연감염, 백신접종, 모체이행항체, 교차반응 등 다양한 원인으로 생산될 수 있기 때문에 혈청학적 예찰에서는 구제역의 혈청형과의 관계를 파악하고, 검사방법과 검진두수에 대한 표본검사계획을 수립하는

것이 가장 중요하다. 인적, 물적 자원이 한정되어 있는 상황에서 표본검사계획은 과학적이고 통계학적인 원리에 근거해야 한다. 그 이유는 적정 수준의 신뢰도가 보장된 검사법과 표본추출방법을 사용해야 표본조사를 통해 얻은 결과를 바탕으로 모집단에 대한 유효한 추론을 할 수 있고, 국제적으로 신뢰받을 수 있기 때문이다(3,4).

OIE에서는 백신접종을 실시하는 국가가 청정화를 선언하는데 필요한 전제조건으로 첫째, 정기적이고 즉각적인 동물 질병 보고시스템과 기록을 유지할 것 둘째, 최근 2년간 구제역 발병사례가 없는 상태로 최근 1년간 구제역 바이러스가 검출되지 않을 것 셋째, OIE에서 제시하는 가이드라인에 따

른 예찰, 조기검출, 예방, 통제 및 백신접종 프로그램 운영 및 그에 관한 기록을 유지할 것 넷째, 지역화를 적용할 경우 그 방법과 범위에 대한 세부사항을 문서화할 것 등을 요구하고 있다. 일단 청정화지위를 인정받더라도 이러한 사항에 관한 기록들을 매년 갱신하여 OIE에 보고하여야 한다. 이러한 국제적 요구조건에 따라 정부에서는 구제역에 대하여 임상적, 바이러스학적, 혈청학적 예찰 프로그램을 운영하고 있으며, 2012년 계획에 의하면 통계예찰 60,884두, 중돈장 검사를 포함한 목적예찰 115,232두, SP 백신항체형성여부 조사 88,949두 등 총 265,065두에 대한 검진을 목표로 설정하고 있다. 전체적으로 볼 때 본 예찰 프로그램에 명시된 표본크기는 프로그램의 구체적인 목적과 다소 상이하게 계획된 것으로 판단되었다. 예를 들어 층화 2단계표본추출에 근거하여 통계예찰 목적으로 할당된 표본크기는 해당 모집단에서 적어도 1두의 감염된 개체를 검출하는 수준으로 계획된 것으로 비발생 증명에 적합하지만 NSP 항체검출용으로는 과도하게 산정한 것이다. 또한 이러한 검진두수는 표본크기 계산을 위해 적용한 모수에 따라 차이를 보일 수 있음을 감안하더라도 비발생 증명을 위해서는 검진두수가 과소추정된 것으로 판단된다. 또한 고위험 집단을 목표로 하는 목적예찰에 할당된 표본크기에 대해서는 통계학적 근거가 명시된바 없다.

OIE에서는 구제역 바이러스 전파를 차단하는 질병 관리 프로그램의 한 부분으로 백신접종을 허용하고 있으며, 이 경우 백신을 접종한 모집단이 방어 면역을 유지하기 위해서는 최소 80%를 유지해야 한다고 규정하고 있다. 이는 모집단의 면역수준이 적정 수준 이상으로 유지되는지를 확인하는데 필요한 표본크기를 계산해야 함을 의미하며, 본 연구에서 제시된 방법론(Table 3, 4)을 적용할 경우 최적의 표본크기를 결정하는데 유용할 것으로 판단된다. 백신접종 정책을 시행한 상황에서 구제역을 효과적으로 관리하기 위해서는 지속감염 혹은 보독동물을 보이는 개체를 검출하여 모집단에서 제거하는 것이 매우 중요하다(10,12). NSP 항체 양성축을 비롯한 고위험집단 검색을 목표로 하지 않는 현행 목적예찰은 의미가 없기 때문에 통계예찰을 강화하는 것이 바람직한 것으로 사료된다. 일반적으로 검사두수가 증가하면 표본추정치의 정확도는 증가하지만, 향상된 정확도의 크기에 비해 검진두수가 지나치게 크면 혈청검사의 경제적 효율성이 훼손된다. 또한 층화 2단계 표본추출법을 사용하여 혈청검사 두수를 계산할 때 검사법의 민감도와 특이도, 축군 내 유병률, 축군 크기, 축군수준 민감도와 특이도, 축군 간 유병률, 신뢰수준 등(2,3,5,9,10) 등에 대한 모수 가정이 적절해야 하며, 이들 모수의 일부는 경시적으로 변할 수 있기 때문에 향후 혈청학적 예찰계획을 수립할 때 이러한 사항을 고려할 필요가 있다.

국가, 지역, 도 단위 등과 같이 대규모 지역에 대한 혈청학적 조사에서는 개별 동물을 모두 확인하여 표본추출구조를 작성하는 것이 현실적으로 불가능하기 때문에 이러한 문제점을 해결하는 대안으로 2단계표본추출법을 사용한다(3,7). 이 방법은 표본추출이 2단계에 걸쳐 이루어지며, 1단계에서는 해당 지역 내 농장 개수에 대한 표본추출구조를 작성하

여 계산된 농장을 선발하고, 2단계에서는 선발된 농장 내에서 모든 개별 동물에 대한 표본추출구조를 작성하여 계산된 표본크기를 선발하게 된다. 본 연구에서 가정한 모수를 적용하면 총 779,736두(Table 5)가 필요한 것으로 추정되었으며, 층화수준을 줄이면 표본크기는 현저히 감소한다. 이러한 표본추출 방법은 전체 모집단을 조사하는 것이 아니라 상대적으로 적은 농장을 방문하게 되므로 현장에서 적용하기 용이하며 비용도 절약되는 장점이 있다. 또한 1단계의 농장 개수와 2단계의 농장 내 개체수를 적절히 조정하면 이를 태면 농장 개수를 줄이고 농장 내 개체수를 증가시키는 모수를 사용하게 되면 최소의 비용으로 동일한 정확도를 달성하는 것이 가능하다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 농림수산검역검사본부 (현 농림축산검역본부)의 용역연구개발사업(Z-1541779-2012-12-03)과 2010년도 국립수의과학검역원 용역연구사업 (과제번호: Z-AD17-2009-09-01, 통계학적으로 유효한 국가 동물질병 모니터링 체계 구축- 2 소 및 닭 질병)의 지원에 의해 수행되어 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Anonymous. Report on the foot-and-mouth disease epidemic. Ministry of Public Administration and Security, Seoul. 2011; 721-724.
2. Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, Paton DJ, Sammin DJ, Greiner M, Grazioli S, De Simone F, Yadin H, Haas B, Bulut N, Malirat V, Neitzert E, Goris N, Parida S, Sorensen K, De Clercq K. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2006; 24: 6966-6979.
3. Cameron AR, Baldock FC. Two-stage sampling in survey to substantiate freedom from disease. *Prev Vet Med* 1998; 34: 19-30.
4. Cameron AR. Survey toolbox: a practical manual and software package for active surveillance of livestock diseases in developing countries. Ver 1.0. Australian Center for International Agricultural Research. Canberra, Australia, 1999.
5. Carpenter TE, Thurmond MC, Bates TW. A simulation model of intraherd transmission of foot and mouth disease with reference to disease spread before and after clinical diagnosis. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 11-16.
6. Davies PR, Wayne SR, Torrison JL, Peele B, de Groot BD, Wray D. Real time disease surveillance tools for the swine industry in Minnesota. *Vet Ital* 2007; 43: 731-738.
7. Farver TB. Disease prevalence estimation in animal populations using two-stage sampling designs. *Prev Vet Med* 1987; 5: 1-20.
8. Fosgate GT. Modified exact sample size for a binomial proportion with special emphasis on diagnostic test parameter estimation. *Stat Med* 2005; 24: 2857-2866.
9. McDermott JJ, Schukken YH, Shoukri MM. Study design and analytic methods for data collected from clusters of animals. *Prev Vet Med* 1994; 18: 175-191.

10. Paton DJ, de Clercq K, Greiner M, Dekker A, Brocchi E, Bergmann I, Sammin DJ, Gubbins S, Parida S. Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. *Vaccine* 2006; 24: 6503-6512.
11. Sobrino F, Sáiz M, Jiménez-Clavero MA, Núñez JI, Rosas MF, Baranowski E, Ley V. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* 2001; 32: 1-30.
12. Tenzin, Dekker A, Vernooij H, Bouma A, Stegeman A. Rate of foot-and-mouth disease virus transmission by carriers quantified from experimental data. *Risk Anal* 2008; 28: 303-309.
13. Yoon SS, Kim BH, Shin MS, Yoon HC, Kim YJ, Chang WS, Hwang SC, Seo YS, Lee YJ, Jung JW, Kim DK. Epidemiological report of the 2010-2011 foot-and-mouth disease epidemic. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Seoul. 2011, 209-274.