

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000701

行政院衛生署疾病管制局 103 年度科技研究發展計畫

計畫名稱：藥癮者感染愛滋病毒盛行率或發生率等流行病學調查

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：陳昶勳、高振峰、謝承鈺

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目錄

封面

目錄

壹、計畫中文摘要	3
貳、計畫內容	
一、研究簡介	4
二、材料方法	7
三、結 果	11
四、討 論	14
五、參考文獻	15

共 (16) 頁

壹、計畫中文摘要：

關鍵詞：HIV-1, 發生率, 危險行為

臺灣從 1985 年確認第一例本土愛滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)病患，隨即感染人數不斷攀升，在過去 25 年間，在 2005 年達到最高峰，感染 HIV-1 人數累計有 10,709 人。到 2010 年 8 月底，依據台灣疾病管制局的疫情調查資料顯示，感染人類免疫不全病毒第一型(Human immunodeficiency virus type I, HIV-1)的人數已經達到 21,362 人，發病人數為 8,048 人，因而致死的人數為 3,222 人。感染 HIV-1 的主要危險行為為同性間性行為(MSM)、異性間性行為及注射藥癮者。

為了解每年 HIV-1 之新感染人數之趨勢，以及新感染個案在各危險行為之分布變化，以掌控 HIV-1 傳染趨勢，進行此項研究。目前對於每年 HIV-1 個案是否為新個案之判斷流程是先以 HIV-1 篩檢試驗陽性之檢體，再以 HIV-1 西方墨點法確認試驗來確認為 HIV-1 陽性個案。此陽性個案如非台灣疾病管制局資料庫中之舊案，則歸屬為新感染個案。此方法無法分辨此陽性個案為近期感染或是長期感染，難免產生統計上的偏差。為了解決此偏差，本計畫分析 HIV-1 匿名篩檢陽性個案血液中對 gp41 反應的 HIV-1 specific IgG 含量，來區分 HIV-1 感染者屬於近期感染或長期感染。由於 HIV-1 感染者血液中 HIV-1 specific IgG 抗體的含量，會隨著感染 HIV-1 後的時間而增加，藉由分析血液中 anti-HIV IgG 與 non-anti-HIV IgG 的比例關係，可推估是否為近期感染。

本計畫預計收集台灣 2011-2013 年約 1200 個 HIV-1 western blot 陽性之個案，並依照當年度不同危險行為族群，同性間性行為及注射藥癮，進行發生率分析實驗。

貳、計畫內容

一、研究簡介：

為完成本計畫，實驗將依下列工作項目逐步完成計畫：

1. 蒐集 HIV-1 藥癮者族群陽性個案檢體：2011-2013 年蒐集約 615 件 HIV 篩檢陽性且 western blot 檢驗結果為陽性之個案。
2. 蒐集 HIV-1 MSM 陽性個案檢體：2011-2013 年蒐集約 650 件 HIV 陽性且 western blot 檢驗結果為陽性之個案。
3. 進行 HIV-1 發生率實驗。
4. 進行 2011-2013 年發生率及盛行率趨勢分析。
5. 個案基本資料比對：建立個案基本資料，以及與權責組資料庫核對其疫情調查資料，區別個案之 HIV-1 感染之危險行為。
6. 提供分析數據並與權責組討論，分析 HIV-1 傳染途徑之變化，以擬定防治預防策略。

本計畫預期了解 HIV-1 2011-2013 之發生率或盛行率變化情形，對於 HIV-1 每年新感染個案的數量能有全盤性的認知，並了解 2013 年，HIV-1 發生率在不同危險因子中之變化情形，更進一步了解 HIV-1 在不同危險族群間之傳染路徑變化，結果將提供擬定 HIV-1 防治政策參考。

本計畫使用血清學方法來偵測近期 HIV-1 感染，推估 HIV-1 發生率以及流行狀況，已經越來越受重視^{1,4}。之前調查發生率的方法是從盛行率資料以及存活率的假設條件下來估計發生率，藉由 AIDS 個案的疫情調查報告、發病時間點回推、個案自我陳述的血清學檢驗資料、或匿名篩檢調查資料等來估計發生率⁵⁻⁹。然而這種調查發生率的傳統方法需要 HIV-1 先前的檢驗報告，以及長期的追蹤可能感染 HIV-1 的個案，需要耗費很長的時間、很多的人力與經費，並且會因為參與人數的數量、行為的改變、預防措施的介入、潛伏期時間不一致、或是個案追蹤失敗等等，常會有數據的偏差。但是使用實驗室的血清學方法來分析發生率可以減少上述方法所遭遇的問題。由於實驗技術不斷的進步，目前有發展出來數種偵測 HIV-1 近期感染的方法^{3,4}。這些方法主要偵測原理是分析 HIV-1 感染初期的特徵，比如偵測 HIV-1 RNA、HIV-1 p24、抗體價數、比例、avidity 等特徵，來區別是否為近期感染個案。藉由區別出近期感染個案的件數，就可以推估出發生率。

1985 年台灣確認第一例本土愛滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)病患，

隨即感染人數不斷攀升，到 2005 年達到最高峰，感染 HIV-1 人數累計有 10,709 人 (<http://www.cdc.gov.tw/public/Attachment/7122714134371.pdf>)。到 2010 年 8 月底，依據台灣疾病管制局的疫情調查資料顯示，感染人類免疫不全病毒第一型(Human immunodeficiency virus type I, HIV-1)的人數已經達到 21,362 人，發病人數為 8,048 人，因而致死的人數為 3,222 人(<http://www.cdc.gov.tw/public/Attachment/19617151471.xls>)。感染 HIV-1 的主要危險行為為同性間性行為、異性間性行為、雙性間性行為及注射藥癮者。台灣在 2005 感染 HIV-1 達到近年來的高峰，為了控制 HIV-1 疫情擴散，在 2005 年 8 月實施減害計畫(Harm Reduction Programme)，這計畫包括針具交換計畫(needle-syringe exchange programme)，以及美沙東替代療法(Methadone substitution treatment)。經過一年的追蹤研究，發現有實施針具交換計畫的都市，HIV-1 發生率由每十萬人 13.9 人降低到 13.3 人，相反的，沒有實施針具交換計畫的都市，HIV-1 發生率由每十萬人 11.5 人增加到 15.3 人¹⁰。顯示實施減害計畫對於控制 HIV-1 疫情擴散有其成效，但對於其他年份之危險行為族群的發生率則尚待進一步的實驗分析調查。

美國的疾病管制局的 Hall 等人所組成的 HIV-1 發生率監測團隊，於 2008 年發表了第一個由實驗室數據支持的精確國家 HIV 發生率。在他們的數據中證實美國在 2006 年的新增病例約 56300 人，而在他們 2006-2009 年的逐年觀測中，他們也發現，雖然各危險族群的發生率並無太大變化，但在 13-29 歲的年輕族群卻上升了 21%。原因是年輕的 MSM 發生率上升了 34%，在黑人的年輕的 MSM 發生率更是上升了 48%^{11,12}。根據美國 CDC 的 Hall 等人在他們接下來 2007-2009 年的逐年觀測中，2007 年的新增病例約 56300 人，2008 年的新增病例約 47800，最後 2009 年的新增病例約 48100 人。以美國的三大族群(白人、西班牙語系、黑人)來區分，他們發現西班牙語系族群的流行病學的感染衝擊指數 (The impact of the epidemic with rate) 是白人的幾乎近三倍(2006-2009: 2.8、3.0、3.0、2.9 倍)，而黑人族群的流行病學的感染衝擊指數更是白人的七倍以上(2006-2009: 7.4、7.1、8.4、7.7 倍)。美國也於 2006 年七月建立了橫跨全美五十州的發生率及監測通報系統，因為系統是動態變化的，所以能得到最完整的資訊。根據這個資料庫的細節，美國 CDC 認為使用實驗室分析的發生率及其構建的資料庫能提供政府及醫療單位，對特殊的感染情況 (如黑人族群及其年輕的 MSM)，做

制定政策之參考依據。美國 CDC 也和泰國的 CDC 合作，以實驗室分析的發生率調查泰國的 HIV 發生率。在他們的研究中也指出，以實驗室分析的發生率為基礎所建立的資料庫的確能提供較精確的感染時間和傳染模式，也能獲得更完整、更精確的國家愛滋病毒抗藥性的流行病學藍圖¹³。

本計畫採用美國疾病管制局 (U.S. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 發展的 BED EIA HIV-1 incidence test 試劑來分析個案是否為近期感染個案^{14, 15}。此試劑測量 anti-HIV-1 gp41 IgG 佔全部 IgG 的比例，來區別是否為近期感染個。Anti-HIV-1 gp41 IgG 此抗體結合的抗原為數種 HIV-1 亞型所具有的 gp41 抗原位置。此試劑所測到的 Anti-HIV-1 gp41 IgG 可在血清轉換(seroconversion)後的兩年內升高^{15, 16}。偵測此 Anti-HIV-1 gp41 IgG 的升高程度，可以推算出 HIV-1 近期感染的比例，進而得到 HIV-1 的發生率，了解不同危險行為族群及不同危險因子(年齡、性別、地區)之發生率，可以進一步的了解 HIV-1 傳染途徑的變化，進而擬定合乎時宜的預防感染政策，對於 HIV-1 防疫工作有很大的助益。

二、材料方法

檢體收集

本計畫預計收集台灣2011-2013年約1200個HIV-1 western blot陽性之個案，並依照當年度不同危險行為族群，同性間性行為及注射藥癮，進行發生率分析實驗。

HIV-1 血清學檢測

檢驗方法主要透過粒子凝集法初步篩選和西方墨點法確認，方能判讀為陽性個案。

粒子凝集法-主要是利用 fujirebio 公司製造之 serodia HIV 1/2 套組，其原理為利用人工膠粒（Gelatin Particle）做載體（Carriers），再分別吸附（Coating）一層第一型或第二型去活化愛滋病毒抗原。若血液中存在第一型或第二型抗體，基於免疫反應原理，則會形成凝集現象，故可藉此判定人體血清或血漿中是否含有愛滋病毒之抗體。方法步驟如下：

1. 新開封試劑應於試劑盒上備註使用日期，冷凍乾燥之粒子其復原方式為：未敏感化粒子 D 瓶加入復元液（A）2 mL；第一型抗原敏感化粒子（C-1）及第二型抗原敏感化粒子（C2）則各加入 1.5 mL，已完成復原粒子應註明復原日期，溫和搖晃後置於室溫三十分鐘，待粒子完整復原始可使用。
2. 將 96 孔微量測定盤上標記檢體編號及加入試劑之代號。
3. 實驗組：於第一孔滴入血清稀釋液（B）75 mL，第二孔至第四孔各 25mL，陽性對照組：第一型（PC1）與第二型（PC2）之對照組需分別測定，第一孔滴入血清稀釋液（B）75 mL，而第二至第八孔則均滴入 25 mL
4. 實驗組：以微量吸管分別吸取 25 mL 血清檢體加入第一孔中，並在液面下吸放混合至少五次，吸 25 mL 移入第二孔，同樣混勻後，再取 25 mL 移入第三孔，同樣混勻後，於第四孔吸 25 mL 連同微量吸管丟棄於可高壓滅菌之廢棄物容器內。陽性對照組：取對照用陽性血清（E）各 25 mL 分別加入第一型（PC1）及第二型（PC2）之第一孔，然後作二倍連續稀釋至第八孔後再丟棄 25 mL。
5. 實驗組及陽性對照組均於第二孔加入 25 mL 未敏感化粒子（D），當作陰性血清對照；實驗組：加 25 mL 第一型敏感化粒子（C1）於第三孔，加 25 mL 第二型敏感化粒子（C2）於第四孔。陽性對照組：第一型（PC1）的第三孔至第八孔各加 25 mL（C1），第二型（PC2）的第三孔至第八孔各加（C2）敏感化粒子 25 mL。
6. 將 96 孔微量測定盤振盪混合均勻後，加透明封膜於盤上，並註明實驗起訖時間，靜置

於不易接觸及震動之平面上，於室溫下靜置二小時，使血清中之特異性抗體與抗原結合形成凝集；如未敏感化粒子呈現凝集現象則需進行 7 至 10 步驟。

7. 取已經溶解復元的未敏感化粒子 350 mL，加入一尖底離心管中。
8. 再將 50 mL 血清檢體加入離心管中，使用 tube mixer 加以完成混合，在室溫下放置 20 分鐘以上（靜置期間可震盪 1~2 次）。
9. 將試管進行離心沉澱（2,000 rpm/5 分鐘/室溫）完全分離，取得上清液 50 mL 置入 U 型盤第 2 孔中。
10. 重複 4-5 步驟。

西方墨點法-主要是利用 Bio-rad 公司製造之 new lav blot - I 套組，其原理為利用電泳原理，將愛滋病毒蛋白質依不同分子量大小分離，再運用轉印技術將電泳膠內之蛋白質移轉至硝化纖維膜試紙表面作保存，以偵測與之相對應存於人體血清或血漿中抗體的試驗法。方法步驟如下：

1. 以鑷子依序夾取出含有硝酸試紙條之末端置於反應槽中，號碼應朝上，每批次實驗所需試紙條之數量，除檢體數外需再加二條（陽性、陰性）進行對照組之平行測試。
2. 於反應槽下方以油性筆註明檢體流水號、陰性、陽性對照組。
3. 於各凹槽內加入 2 mL 洗滌液後開啟震盪板搖 5 分鐘，使試紙條充分濕潤。
4. 分別加入各 20 mL 血清檢體、陰性及陽性對照液於相對應之反應槽中，於室溫下加蓋搖擺作用 2 個小時。
5. 以負壓抽吸器吸乾各反應槽內之液體。
6. 各注入 2 mL 洗滌液，搖擺 5 分鐘後吸乾，重複此清洗步驟三次。
7. 各注入 2 mL 的結合液，加蓋後在室溫中搖擺作用一小時。
8. 重複步驟 5.6.5 至 5.6.6；洗滌三次。
9. 各注入 2 mL 之呈色液，搖擺作用約 5 分鐘使之呈色。
10. 以負壓抽吸器吸乾反應槽內液體並以二次蒸
11. 以負壓抽吸器吸淨反應槽內液體，在不損傷試紙條之情況下盡可能吸乾。
12. 抽吸管尖則以 10% 漂白水消毒後再以清水沖洗。
13. 比對呈色反應判讀後發報告，反應後之試紙條則遮光陰乾後黏貼。

HIV-1血清轉換(seroconversion)

為了鑑定HIV-1是否是近期感染，使用一種IgG結合酵素免疫法來測量在血液檢體中的總體IgG抗體中HIV-1-特異性IgG 的比例。BED EIA HIV-1 incidence test (capture enzyme immunoassay; Calypte, MD)是一種使用含有三個分支胜肽聚合體的商業套組。每一個分支胜肽是由合成的寡胜肽鏈所構成，寡胜肽鏈是源自HIV-1 B, CRF01_AE, and D 亞型內gp41 醣蛋白的免疫優勢區域。在使用這組試劑的技術訓練時，需要遵守製造商的使用說明。操作前試劑與檢體應先回溫(15~30°C)，反應前首先配製1倍清洗液混合100 ml 10倍清洗液與900 ml 去離子水，以攪拌棒在自動攪拌器攪拌至少10分鐘。可存放2~8°C一星期，再來準備稀釋液(3% BSA + 一倍清洗液)，3 gm BSA 加入100 ml 一倍清洗液適用一整盤(96孔)，利用自動攪拌器至少攪拌10~15分鐘，直到BSA完全溶解。稀釋液可存放2~8°C，可保存兩天。接著將待測檢體與對照組檢體1:101倍稀釋將以稀釋過之100 μ l檢體移至試劑測驗盤下(內已coating anti-Human IgG)，放進37°C溫箱1小時。在靜置1小時完成前10分鐘以備好的稀釋液來稀釋HIV-1 BED Peptide (1:1001)，反應1小時後，以96孔盤自動清洗機清洗兩次，反轉後再清洗兩次，每孔以300 μ l清洗，每次間隔10秒，最後一洗以拭手紙包住反應盤翻轉，用力拍打以移去多餘水分。多管分注器加入100 μ l已稀釋(1:1001)之HIV-1 BED peptide至每反應孔，靜置一小時。一小時後，以上述方法清洗96孔盤，並且使用多管分注器加入100 μ l稀釋過之streptavidin-HRP conjugate (1:1001)至每一反應孔，靜置37°C 時間90分鐘。反應完成後，以自動清洗機清洗，加入100 μ l TMB受質於每一反應孔，5°C靜置15分鐘，觀察其呈色反應。以分注器加入100 μ l終止溶液，停止反應之呈色。一個小時內，以450 nm波長，參考值630至650 nm測量其OD值(optical density, OD)。為降低每一次反應間之變異性與維持再現性，將計算ODn值(normalized OD)，其計算方法為：

$$\text{ODn control} = (\text{OD control之平均值}) \div (\text{OD校正參數之平均值})$$

$$\text{ODn 檢體1} = (\text{ODn 檢體1}) \div (\text{OD校正參數之平均值})$$

簡單的說，待測的檢體一開始只上樣一次，如果標準化OD (ODn) >1.2，檢體來源就判定是long-term seroconverter (長期的血清轉換者)。若檢體ODn \leq 1.2就需要做三重複的測試來確認其值。在確認的試驗中，檢體ODn值 \leq 0.8就會被認定是recent seroconversion (近期的血清轉換)。如果標準化OD (ODn) >0.8，檢體來源就判定是long-term seroconversion (長期的

血清轉換)。

發生率分析

使用下列的公式來計算該年發生率(incidence)：

$$I = \frac{(365/w) N_{inc}}{N_{neg} + (365/w) N_{inc}/2} \times 100$$

I: incidence

w: window period

N_{inc}: number recent HIV infection

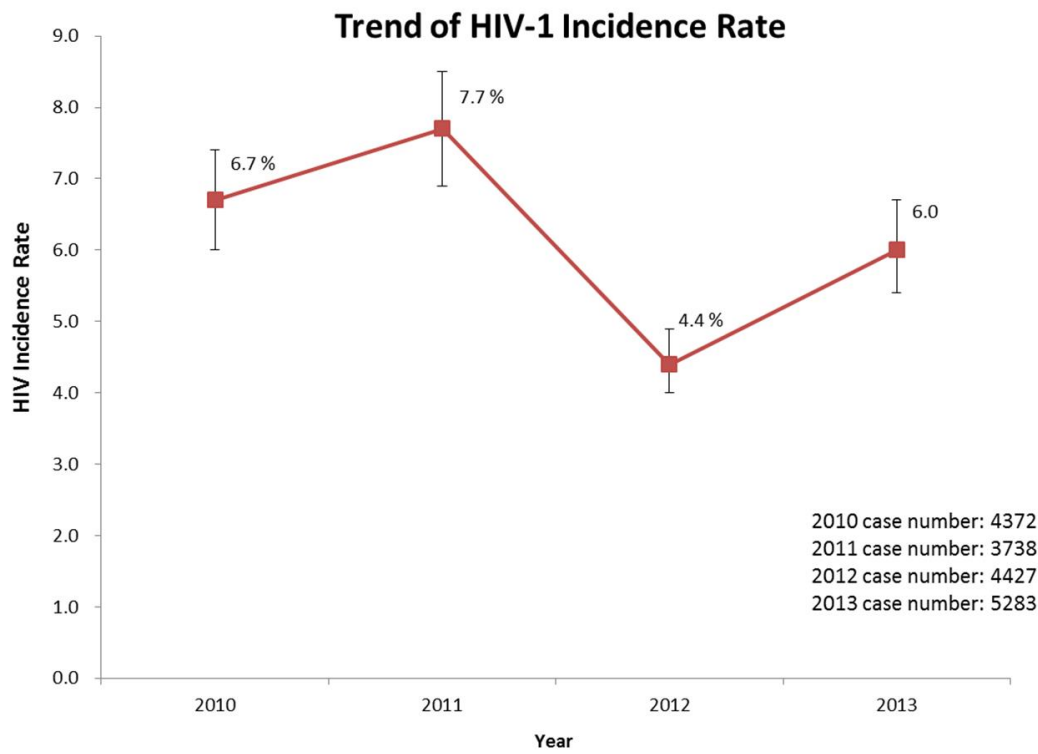
N_{neg}: number HIV seronegative

計算出該年發生率後，比較不同年份及不同危險行為族群之發生率。

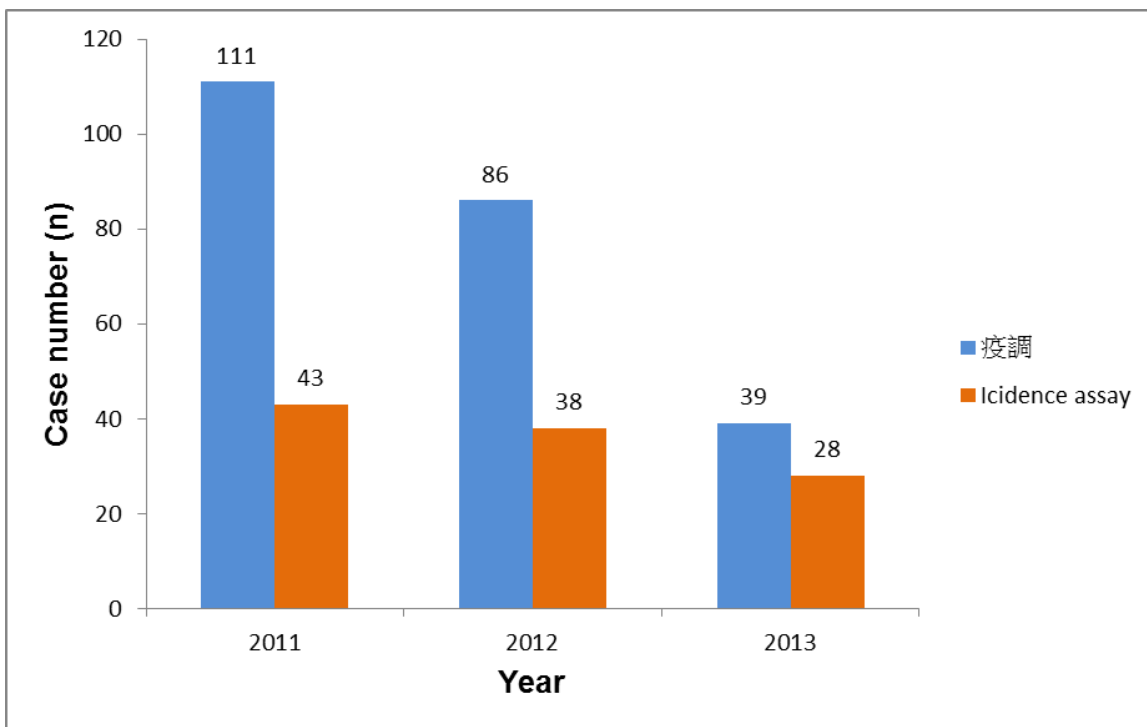
三、結果

1. 完成 2011-2013 年 HIV 陽性確認檢體危險因子勾稽，並進行 650 件 MSM 個案及 615 件 IDU 之發生率分析。
2. 2013 年匿篩同性戀族群使用 BED 實驗方法分析，估計發生率為 6.0 % (圖一)，較 2012 年發生率(4.4%)有增加的趨勢。
3. 分析 IDU 族群的發生率，以 BED 實驗方法和疫情調查的結果比較，從 2011-2013 疫情調查統計的近期感染人數皆比 BED 方法所得到的近期感染人數高(圖二)。
4. 由 2009-2012 發生率在不同年齡層分布圖可知(圖三)，21-30 歲年齡層 HIV 發生率逐年遞增，有逐漸增加的趨勢。
5. 已發表一篇 SCI paper. Changes in HIV Incidence among People Who Inject Drugs in Taiwan following Introduction of a Harm Reduction Program: A Study of Two Cohorts. PLoS Medicine | Apr. 08, 2014。

圖一、匿名篩檢族群中,MSM 的 HIV-1 發生率

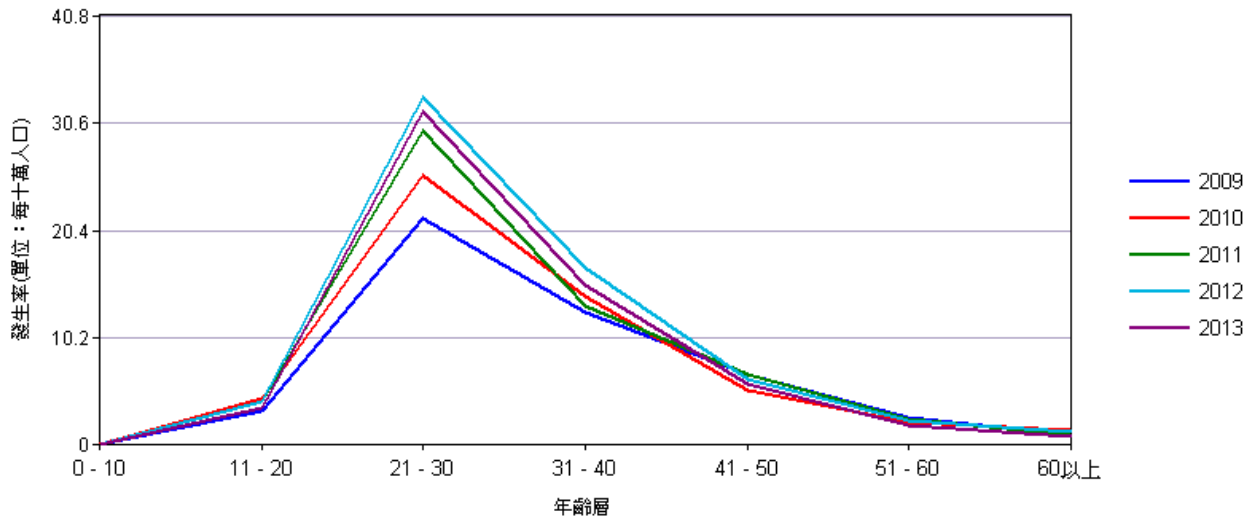


圖二、2011-2013 IDU 族群以發生率實驗分析，近期感染 HIV 人數



圖三、2009-2013 年齡層發生率分佈總圖

全國HIV感染(含母子垂直感染疑似個案)含本國籍及非本國籍病例(2009/01/01-2013/11/30)年齡別發生率趨勢圖



資料來源：疾病管制署 Taiwan CDC 2013/11/22

四、討論

2013 年度匿篩 HIV 陽性且為 MSM 個案，使用 BED 實驗方法分析推估發生率為 6.0%，較 2012 年發生率(4.4%)有增加的趨勢，需要繼續觀察變化趨勢，以了解 MSM 族群感染 HIV 的情況是否越來越嚴重。另外，統計 IDU 族群感染 HIV 的近期感染人數，皆較疫情調查資料當年度通報人數低，顯示當年度通報 HIV 人數，有部分個案為非當年度感染，可能為前幾年就已經感染，只是當年度才被發現感染 HIV，而列為當年度的個案。對於這些先前即已經感染 HIV，但仍不清楚本身已經感染的個案，可深入探討其原因，擬定適當的政策來加強 HIV 篩檢，及早發現 HIV，對於疫情控制有很大的意義。

BED 實驗方法其所估算的發生率，可減少因個案隱匿個人危險行為，未誠實告知所導致發生率低估的誤差。由 2011-2013 發生率趨勢圖，可觀察到匿篩 HIV 陽性且為 MSM 個案，在 2012 年有下降的趨勢，但根據疫情調查資料，2010-2012 年 MSM 人數呈現增加的趨勢，與發生率趨勢相反，此原因可能為個案重複匿名在同間醫療院所或其他醫療院所，重複採檢檢驗 HIV，導致實驗數據產生誤差。

2013 年發生率實驗數據顯示，感染 HIV-1 的年齡層主要為 21-30 歲，其次為 30-39，以及 11-20 歲，青少年為主要的近期感染 HIV-1 來源，這對社會將造成深遠的影響，建議加強青少年安全性行為宣導。

BED Incidence 試劑會因下列情形而產生 “false-recent” result:

1. 檢體保存不良。
2. HIV 血清學檢測偽陽性（西方墨點確認陰性）個案。
3. 發炎反應或高免疫球蛋白血症。
4. 接受大於六個月抗病毒藥物治療。
5. AIDS 病症末期。

以上狀況須進一步配合病歷及疫調資料，方能提高發生率監測的準確度。目前有新一代的發生率試劑經過美國 CDC 測試合格，準確度較 BED 更高，將蒐集相關文獻及評估報告，採用更精準的試劑來進行後續實驗分析。

五、參考文獻：

1. Rutherford GW, Schwarcz SK, McFarland W. Surveillance for incident HIV infection: new technology and new opportunities. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;25 Suppl 2:S115-119.
2. Rehle T, Lazzari S, Dallabetta G, et al. Second-generation HIV surveillance: better data for decision-making. *Bull World Health Organ*. 2004;82:121-127.
3. McDougal JS, Pilcher CD, Parekh BS, et al. Surveillance for HIV-1 incidence using tests for recent infection in resource-constrained countries. *AIDS*. 2005;19 Suppl 2:S25-30.
4. Busch MP, Pilcher CD, Mastro TD, et al. Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. *AIDS*. 2010;24:2763-2771.
5. Calzavara L, Burchell AN, Major C, et al. Increases in HIV incidence among men who have sex with men undergoing repeat diagnostic HIV testing in Ontario, Canada. *AIDS*. 2002;16:1655-1661.
6. Gregson S, Donnelly CA, Parker CG, et al. Demographic approaches to the estimation of incidence of HIV-1 infection among adults from age-specific prevalence data in stable endemic conditions. *AIDS*. 1996;10:1689-1697.
7. Satten GA, Janssen R, Busch MP, et al. Validating marker-based incidence estimates in repeatedly screened populations. *Biometrics*. 1999;55:1224-1227.
8. Stoneburner RL, Low-Beer D, Tembo GS, et al. Human immunodeficiency virus infection dynamics in east Africa deduced from surveillance data. *Am J Epidemiol*. 1996;144:682-695.
9. Saidel T, Sokal D, Rice J, et al. Validation of a method to estimate age-specific human immunodeficiency virus (HIV) incidence rates in developing countries using population-based seroprevalence data. *Am J Epidemiol*. 1996;144:214-223.
10. Yang CH, Yang SY, Shen MH, et al. The changing epidemiology of prevalent diagnosed HIV infections in Taiwan, 1984-2005. *Int J Drug Policy*. 2008;19:317-323.
11. Hall HI, Song R, Rhodes P, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA*. 2008;300:520-529.
12. Lee LM, McKenna MT. Monitoring the incidence of HIV infection in the United States. *Public Health Rep*. 2007;122 Suppl 1:72-79.
13. McNicholl JM, McDougal JS, Wasinrapee P, et al. Assessment of BED HIV-1 incidence assay in seroconverter cohorts: effect of individuals with long-term infection and importance of stable incidence. *PLoS One*. 2011;6:e14748.
14. Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, et al. Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2623-2628.
15. Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1

antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:295-307.

- 16.** Parekh BS, Hanson DL, Hargrove J, et al. Determination of mean recency period for estimation of HIV type 1 Incidence with the BED-capture EIA in persons infected with diverse subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:265-273.