

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000601

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

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

年度研究報告

執行單位：疾病管制局署

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：黃彥芳、高振峰

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 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、計畫英文摘要	4
參、計畫內容	
一、研究簡介	5
二、材料方法	8
三、結 果	12
四、討 論	15
五、參考文獻	16

共 (17) 頁

壹、計畫中文摘要：

關鍵詞：HIV, 藥癮者, 發生率, 盛行率

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 2005 年達到最高峰，到 2015 年 10 月，依據衛生福利部疾病管制署的疫情調查資料顯示，台灣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 31,644 人，發病人數為 13,876 人，因而致死的人數為 4,946 人。而 2014 年感染 HIV-1 的主要危險行為為同性間性行為(MSM)有 1,717 人(76.8%)、異性間性行為 251 人(11.2%)，雙性間性行為 185 人(8.3%)，以及注射藥癮者 54 人(2.4%)。

為了解每年 HIV-1 之感染人數之趨勢，以及感染個案在各危險行為之分布變化，以掌控 HIV-1 傳染趨勢，而進行此項研究。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。此陽性個案如非疾病管制署資料庫中之個案，則歸屬為新感染個案。此流程無法分辨此陽性個案屬於近期感染(recent infection)或是長期感染(long-term infection)，難免產生統計上的偏差。為了解決此偏差，本計畫分析 HIV-1 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，推估是否為近期感染。

本計畫將探討台灣地區 2011-2014 年間，藥癮者 HIV-1 發生率或盛行率之變化趨勢，以及年紀、性別、地區等不同危險因子之變化，探討 HIV-1 感染途徑之變化，以提供防治 HIV-1 之政策擬定參考。

壹、計畫英文摘要：

In Taiwan, the first indigenous AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) case was reported in 1985, and the number of HIV-1-infected individuals then increased rapidly, reaching a peak in 2005. By the end of October 2015, a cumulative total of 31,644 HIV-1-infected individuals, 13,876 individuals with illness, 4,946 deaths were reported to the Taiwan Centers for Disease Control. The main risk behaviors for HIV-1 infection are MSM (Men who have sex with men), heterosexual, and IDU (injection drug user).

This study aims to investigate the trends of new infected case numbers of HIV-1 infection annually and the variation in different risk behaviors. The case definition for new infected HIV-1 cases must fulfill some criteria. First, the results of HIV-1 screening and confirmatory test for these cases are positive. Then, these cases are compared with Taiwan CDC HIV-1 database. If the cases don't exist in this database, they belong to a new reported HIV-1 infection case.

Nevertheless, this method has statistical deviations and may mis-classification of these new patients due to late diagnosis and/or delay identification. To solve the problem and get a more clear picture of new HIV infections, this study apply anti-gp41 IgG quantity in HIV-1 positive cases to distinguish recent infection from long term infection. Anti-gp41 IgG quantity is increasing with time in HIV-1-infected individuals. We can judge whether the case is recent infection by the ratio of anti-gp41 IgG.

This study will investigate the trends of HIV-1 incidence and evaluate the incidence variation among heterosexual, MSM, IDU, gender, age and area between 2011 and 2014. The study results could be used to formulate the strategies to prevent HIV-1 spreading.

Keywords: HIV, IDU, incidence, prevalence

參、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. 蒐集藥癮者族群 HIV-1 陽性個案檢體：2011-2014 年蒐集約 200 件 HIV 陽性個案檢體，此陽性檢體為 HIV-1 western blot 檢驗結果為陽性之個案。依據發生率結果以及母群體總數，我們可依公式推出該年度 HIV-1 年藥癮者真實發生率結果。
2. 進行分析 HIV-1 發生率數據：進行 2011-2014 年發生率趨勢分析以及發生率變化。
3. 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。
4. 進行 HIV-1 發生率分析實驗。
5. 分析 HIV-1 發生率數據：進行 2011-2014 年發生率趨勢分析以及此期間不同危險行為族群中之發生率變化。
6. 蒐集國外文獻報告，並加以比較分析與國外之差異。
7. 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 2011-2014 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。

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、抗體效價(titer)、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 2015 年 10 月，依據衛生福利部疾病管制署的疫情調查資料顯示，台灣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 31,644 人，發病人數為 13,876 人，因而致死的的人數為 4,946 人 (<http://www.cdc.gov.tw/professional/downloadfile.aspx?fid=C33A9B0633C773AE>)。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 年感染 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。

美國疾病管制局 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 HIV-1 LAg-Avidity EIA 試劑來分析個案是否為近期感染個案^{14,15}。此試劑用有限量的抗原來測量 HIV-1 抗體的 avidity，來區別是否為近期感染個案。感染 HIV-1 後，人體免疫系統早期產生的抗體為 low avidity，隨著感染時間延長，產生抗體的 avidity 會增強，從此特性，可用來區別個案是近期感染還是長期感染，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者，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蔭乾後黏貼。

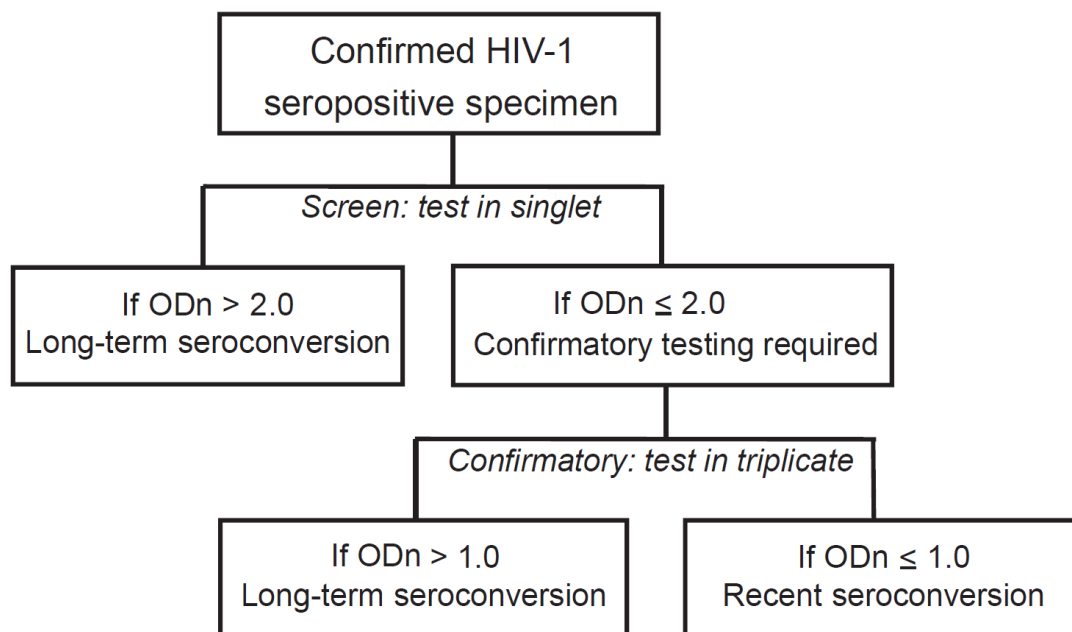
發生率實驗

使用 Sedia™ HIV-1 LAg-Avidity EIA 進行發生率分析。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 檢體及對照組移至反應盤，放進 37°C 溫箱，1 小時。反應 1 小時後，以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，最後一次以拭手紙包住反應盤翻轉，用力拍打以移去多餘水分。使用多管分注器加入 200 μ l Dissociation Buffer 到每反應孔，37°C 靜置 15 分鐘。以上述方法清洗反應盤，再用多管分注器加入 100 μ l 稀釋過之 anti-Human IgG-HRP (1:1001 稀釋) 至每一反應孔，靜置 37°C 時間 30 分鐘。反應完成後，再以上述方法清洗反應盤，洗後加入 100 μ l TMB 受質於每一反應孔，25°C 靜置 15 分鐘，再以分注器加入 100 μ l 終止溶液，停止反應之呈色。以 450 nm 波長，參考波長 630-650 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：

$ODn \text{ control} = (\text{OD control 之平均值}) \div (\text{OD calibrator 之中位數})$

$ODn \text{ 檢體1} = (\text{ODn 檢體1}) \div (\text{OD calibrator 之中位數})$

檢體一開始只做 one well，如果 $ODn > 2.0$ ，檢體來源就判定是 long-term seroconversion。若檢體 $ODn \leq 2.0$ 就需要做三重複來確認其值。在確認的試驗中，檢體 $ODn \leq 1.0$ 就會被認定是 recent seroconversion。如果 $ODn > 1.0$ ，檢體來源就判定是 long-term seroconversion。



發生率分析

依據U.S. Centers for Disease Control and Prevention, the Office of the Global AIDS Coordinator and the UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance 建議的公式計算 HIV-1年藥癮者以及同性間性行為族群發生率。使用下列的公式來計算該年發生率(incidence)：

$$I_F = \frac{R - (FRR * P)}{(1-FRR) \omega N} \times 100$$

I_F = annual HIV incidence rate
 N = number of HIV-negative samples in the survey
 P = number of HIV-positive samples in the survey
 R = number of HIV-positive samples testing as recent on the test
 ω = mean duration of recency for the test specified in years
 FRR = false recent rate for the test

三、結果

1. 完成 2014 年 HIV 陽性確認檢體危險因子勾稽，並進行 508 件 MSM 個案及 26 件 IDU 之近期感染比率分析(表一)。另外針對 IDU 進行 HIV-1 基因型別分析(表二)，主要為 CRF07_BC，有 18 件，2 件 B，1 件 CRF01_AE。
2. 2014 年匿篩同性戀族群使用 LAg-Avidity EIA 實驗方法分析，發生率為 3.3 % (圖一)，較 2013 年發生率(6.0%)有降低的趨勢。
3. 分析 IDU 族群的發生率，以 LAg-Avidity EIA 實驗方法和疫情調查的結果比較，2014 年近期感染比率(50.0%)較 2013 年(25.5%)增加，2014 疫情調查統計的感染人數(52 件)也比 2013 感染人數(48 件)高(圖二)。
4. 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。

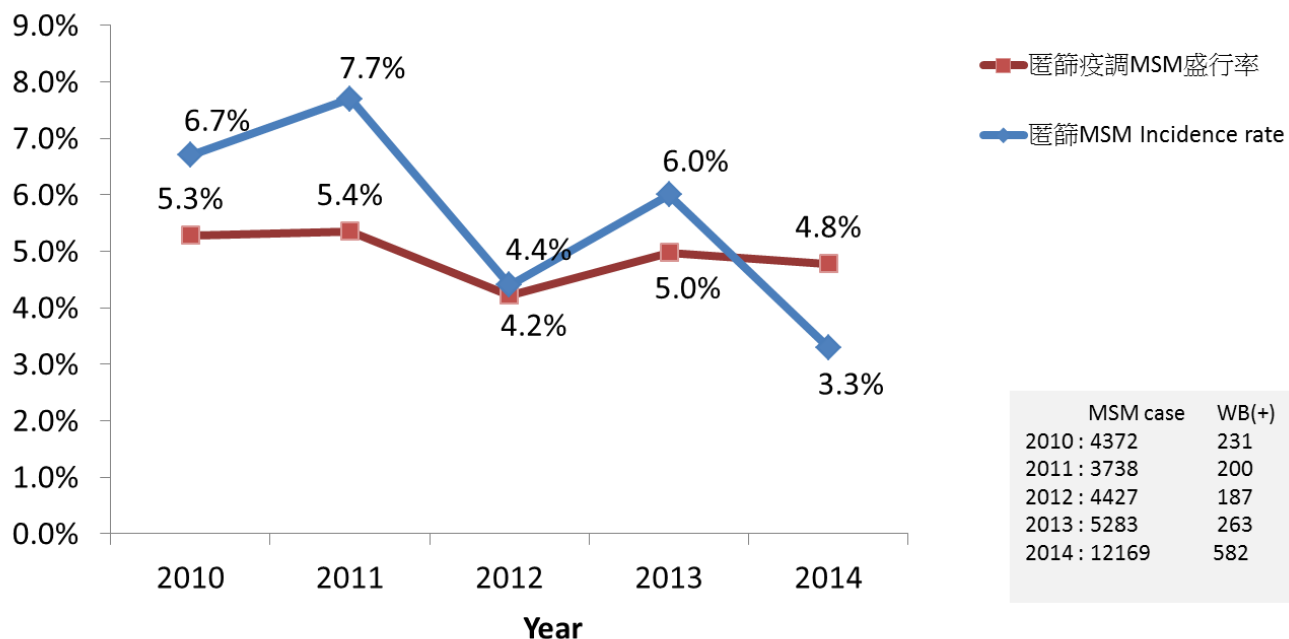
表一、MSM 及 IDU 的 HIV-1 近期感染比率

	Long-term infection (n, %)	Recent infection (n, %)	檢體數量
匿篩 MSM	303 (59.6 %)	205 (40.4%)	508
IDU	13 (50.0 %)	13 (50.0 %)	26

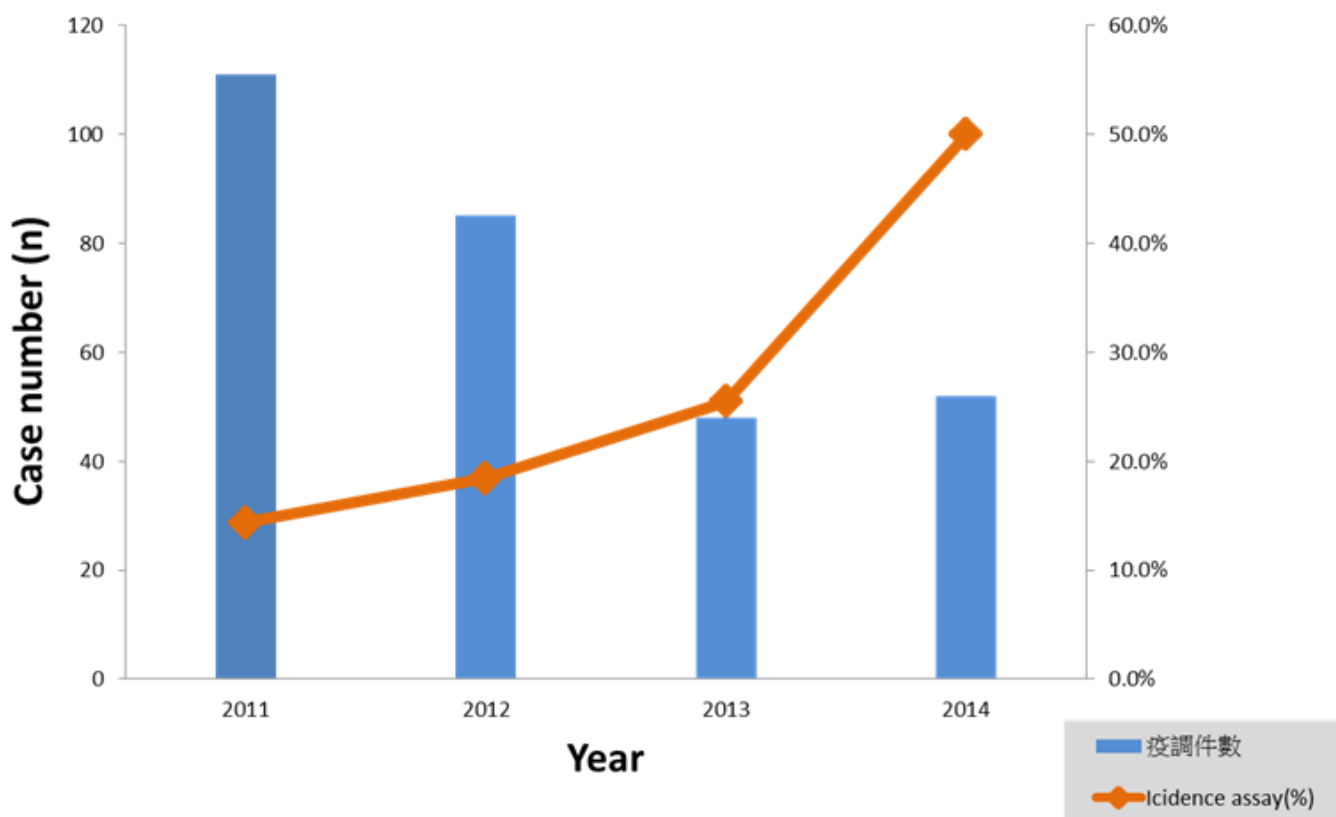
表二、IDU 的 HIV-1 型別分析

型別	
Subtype B	2
Subtype CRF07_BC	18
Subtype CRF01_AE	1
訊號雜亂無法比對	2
病毒量不足	3

圖一、匿名篩檢族群中，MSM 的 HIV-1 發生率及盛行率



圖二、2011-2014 IDU 族群以發生率實驗分析，近期感染 HIV 人數



四、討論

2014 年度匿篩 HIV 陽性且為 MSM 個案，使用 LAg-Avidity EIA 實驗方法分析推估發生率為 3.3%，較 2013 年發生率(6.0%)有減少的趨勢，需要繼續觀察變化趨勢，以了解 MSM 族群感染 HIV 的情況是否有減少的趨勢。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。

LAg-Avidity EIA 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 2010-2014 發生率及盛行率趨勢圖，可觀察到匿篩 HIV 陽性且為 MSM 的發生率與盛行率有類似的上升或下降趨勢，且發生率的變化比率較盛行率來的顯著。能否應用盛行率的變化趨勢來觀察盛行率的走向，仍需後續的繼續觀察。

LAg-Avidity EIA 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。

因此，需採集適當的個案進行實驗分析，方能提高發生率監測的準確度。

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, Asamoah-Odei E. Second-generation HIV surveillance: better data for decision-making. *Bull World Health Organ*. 2004;82(2):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(18):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(12):1655-1661.
6. Gregson S, Donnelly CA, Parker CG, Anderson RM. 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(14):1689-1697.
7. Satten GA, Janssen R, Busch MP, Datta S. Validating marker-based incidence estimates in repeatedly screened populations. *Biometrics*. 1999;55(4):1224-1227.
8. Stoneburner RL, Low-Beer D, Tembo GS, Mertens TE, Asiimwe-Okiror G. Human immunodeficiency virus infection dynamics in east Africa deduced from surveillance data. *Am J Epidemiol*. 1996;144(7):682-695.
9. Saidel T, Sokal D, Rice J, Buzingo T, Hassig S. 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(3):214-223.
10. Yang CH, Yang SY, Shen MH, Kuo HS. The changing epidemiology of prevalent diagnosed HIV infections in Taiwan, 1984-2005. *Int J Drug Policy*. 2008;19(4):317-323.
11. Hall HI, Song R, Rhodes P, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA*. 2008;300(5):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(3):e14748.
14. Longosz AF, Morrison CS, Chen PL, et al. Comparison of antibody responses to HIV infection in Ugandan women infected with HIV subtypes A and D. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(4):421-427.

15. Duong YT, Qiu M, De AK, et al. Detection of Recent HIV-1 Infection Using a New Limiting-Antigen Avidity Assay: Potential for HIV-1 Incidence Estimates and Avidity Maturation Studies. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33328.