

新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay と ダイナスクリーン・HIV Combo の検討

研究分担者 加藤 真吾 (慶應義塾大学医学部)
研究協力者 佐野 貴子、近藤 真規子 (神奈川県衛生研究所)
須藤 弘二 (慶應義塾大学医学部)
小谷 宙、西松 直美 (慶應義塾大学病院 薬剤部)
藤原 宏、長谷川直樹 (慶應義塾大学病院 感染制御センター)

研究要旨

新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo の検討を行った。

新規 HIV 確認検査試薬の Geenius において HIV-1 陽性例を測定したところ、WB 法よりも感度の向上が見られた。また、WB-1 と WB-2 が両方とも陽性となった検体では、Geenius で全例が HIV-1 POSITIVE と判定されたことから、結果解釈の個人差が低減すると考えた。HIV 陰性検体では、130 例のうち非特異バンドが出現したものが WB 法で 31 例、Geenius では 2 例であり、特異性の向上が見られた。

新規 HIV 迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo では、実際の感染初期検体において、従来品で陰性となったが、Combo では抗原を検出することが可能であった。一方、陰性検体の検討では、血漿検体において、従来品ではすべて陰性であったが、Combo では 1 例の抗原陽性が見られた。この検体の全血検体では抗原ラインの出現は見られなかった。特異性についてはさらに検討を進める予定である。

今年度、検討を行った Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo は、ともに従来品よりも性能に優れ、HIV 診断試薬として非常に有用であることが示唆された。

A.研究目的

HIV 診断試薬は年々改良が進んでおり、近年では、迅速スクリーニング検査試薬の抗原抗体同時検査法の開発や HIV 抗体確認検査試薬としてのイムノクロマト法の開発が行われている。HIV 抗体確認検査については、我が国では現在、測定時間の長いウェスタンブロット法が用いられているが、米国ではすでに短時間で測定が可能なイムノクロマト法が認可され、実際に検査アルゴリズムに組み込まれ使用されている。また、迅速スクリーニング検査試薬については、我が国において HIV 即日検査で広く使用されており、ウインドウ

期の短縮が可能な抗原抗体同時検査法の使用拡大は検査の質の向上に繋がると考える。

今回、我が国に導入される可能性のある新規 HIV 確認検査試薬および新規迅速スクリーニング検査試薬について性能検討を行ったので報告する。

B.研究方法

1. 新規 HIV 確認検査試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay の検討

(1) 使用試薬

検討品:Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay (パ

イオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、以下、Geenius と略)

(使用可能検体) 血漿、血清、全血

(検体量) 血漿と血清は 5 μ L、全血は 15 μ L

(操作時間) 30 分

測定方法と結果判定については図 1、図 2 に記した。

対照品：ラブ ブロット 1、ラブ ブロット 2

(バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、以下、WB-1、WB-2 と略)

(使用可能検体) 血清

(検体量) 20 μ L

(操作時間) 約 4 時間

測定は添付文書に従い実施した。

(2) 使用検体

保健所あるいは医療機関で HIV 検査を希望し、スクリーニング検査で陰性と判定された HIV 陰性検体 130 例および WB 法あるいは PCR 法で陽性と判定された HIV-1 陽性検体 113 例について測定を行った。今回の検討に当たっては、受検者に研究使用の同意を得た。

(倫理面への配慮) 本研究は、慶應義塾大学医学部の倫理委員会に倫理審査を申請し、承認を得た(承認番号 20150176)。また、神奈川県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認を得た(平成 28 年 9 月 13 日)。

2. 新規迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo の検討

(1) 使用試薬

検討品：ダイナスクリーン・HIV Combo

(アリーア メディカル株式会社、以下、Combo と略)

(使用可能検体) 血漿、血清、全血

(検体量) 50 μ L

(操作時間) 20 分

対照品：ダイナスクリーン・HIV-1/2

(アリーア メディカル株式会社、以下、従来品と略)

(使用可能検体) 血漿、血清、全血

(検体量) 50 μ L

(操作時間) 15 分

測定方法と結果判定については図 7~10 にまとめた。

(2) 使用検体

保健所あるいは医療機関において HIV 検査を希望しスクリーニング検査で陰性と判定された HIV 陰性検体 229 例、WB 法あるいは PCR 法で陽性と判定された HIV-1 陽性検体 30 例およびダイナスクリーンで偽陽性と判定された 7 例について測定を行った。

(倫理面への配慮) 神奈川県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認を得た(平成 28 年 9 月 13 日)。

C.研究結果

1. 新規 HIV 確認検査試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay の検討

HIV-1陽性検体113例についてGeeniusで測定したところ、HIV-1 POSITIVEと判定されたものが107例、HIV-1 INDETERMINATEとなったものが4例、HIV NEGATIVEとなったものが2例であった

(図3)。GeeniusでHIV-1 POSITIVEと判定された107例のWB法の結果は、WB-1では陽性が104例、判定保留が3例であり、WB-2では陽性が12例、判定保留が92例、陰性が3例であった。

GeeniusのHIV-1 INDETERMINATEと判定された4例では、WB-1は判定保留4例、WB-2では判定保留2例、陰性2例であった。GeeniusでのHIV NEGATIVEの2例では、WB-1とWB-2どちらも陰性であった。

WB-1およびWB-2で陽性となった12例のGeeniusの結果はすべてHIV-1 POSITIVEと判定された

(図4)。WB-1での判定保留7例のGeeniusの結果は、3例がHIV-1 POSITIVE、4例がHIV-1 INDETERMINATEとなった(図5)。WB-1の陰性2例ではGeeniusでもHIV NEGATIVEと判定された。

HIV-1陰性検体130例についてGeeniusで測定し

たところ、128例がHIV NEGATIVE、1例がHIV-1 INDETERMINATE、1例がHIV-2 INDETERMINATEとなった(図6)。GeeniusでHIV NEGATIVEとなった128例では、WB-1とWB-2がどちらも判定保留となったものは6例、WB-1のみ判定保留となったものは18例、WB-2のみ判定保留となったものは7例であった。WB-1での非特異の出現バンドは、P68/66が2例、P55が2例、P34/P31が1例、P24/25が16例、P18/17が5例であった。WB-2での非特異出現バンドはP26が8例、P16が4例であった。GeeniusでHIV-1 INDETERMINATEと判定された1例は、GeeniusでP31のバンドの出現が見られ、WB-1、WB-2とも陰性であった。またHIV-2 INDETERMINATEと判定された1例は、GeeniusでGP140のバンドの出現が見られ、WB-1では陰性、WB-2ではP26の非特異バンドが見られた。

2. 新規迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV Combo の検討

血漿検体と一部全血検体についてComboと従来品との検討を行った。血漿では、HIV陽性検体30例を測定したところ、従来品では陽性が29例、陰性が1例となり、Comboでは抗原のみ陽性が1例、抗原・抗体陽性が2例、抗体のみ陽性が27例と全例が陽性となった(図11)。HIV陰性検体229例では、従来品ではすべて陰性(特異性100%)、Comboでは228例が陰性、1例が抗原陽性となった(特異性99.6%)。また、従来品で偽陽性となった6例についてComboで測定したところ、5例は陰性、1例は抗体のみ陽性となった。Comboで偽陽性となった1例について従来品で測定したところ陰性となった。

全血検体については、HIV陽性検体21例を測定したところ、従来品、Comboともにすべて陽性となった。HIV陰性検体204例でも従来品、Comboともにすべて陰性となった。従来品で偽陽性となった1例についてはComboで測定したところ陰性となった(図12)。

D. 考察

今年度は新規HIV診断試薬であるGeenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo の検討を行った。

新規HIV確認検査試薬であるGeenius HIV-1/2 Confirmatory assay の検討では、HIV-1陽性検体においてGeeniusでは107例がHIV-1 POSITIVEと判定されたが、WB法では、WB-1陽性は104例であり、Geeniusの感度向上が示唆された。また、WB-1およびWB-2で陽性となった13例のGeeniusの結果では、全例がHIV-1 POSITIVEと判定された。これまでWB-1とWB-2がともに陽性であった場合、HIV-1とHIV-2の重複感染なのかHIVの交差反応なのか、その判定に苦慮することがあったが、Geeniusの判定基準に基づき機械的に判定してくれることから、結果の解釈に個人差が生じることは減少すると考えた。HIV陰性検体では、130例のうち、WB法で非特異バンドが出現したものが31例あったが、Geeniusでは2例であり、特異性の向上が見られた。今後、HIV-2陽性検体、治療中のHIV抗体力価低下例、感染初期例等の検体について検討を行っていく予定である。

新規HIV迅速スクリーニング検査試薬であるダイナスクリーン・HIV ComboはHIV-1 p24抗原が検出できることから、ウインドウ期の短縮が可能である。実際に陽性検体の測定では、感染初期検体1例において、従来品では陰性であったが、Comboでは抗原を検出することが可能であった。

一方、陰性検体の検討では、血漿検体において、従来品ではすべて陰性であったが、Comboでは1例の抗原陽性例が見られた。この検体は全血検体では抗原ラインの出現が見られなかった。従来品およびComboの偽陽性例を双方で測定したところ、お互いの偽陽性はほぼ一致しないことが分かった。特異性の検討については、もう少し例数を増やして測定する必要があると考える。

今回、検討を行ったGeeniusおよびComboは、ともに従来品よりも性能に優れ、HIV診断試薬として非常に有用であることが示唆された。

E. 結論

今年度は新規 HIV 診断試薬である Geenius HIV-1/2 Confirmatory assay およびダイナスクリーン・HIV Combo の検討を行った。どちらの試薬も従来品よりも性能に優れ、HIV 診断試薬として非常に有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, Ueda T, Fujiwara H, Hasegawa N, Kato S. (2016) A Qualitative Real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. Japanese Journal of Infectious Diseases. 69:367-372. DOI: [10.7883/yoken.JJID.2015.309](https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.309)
- 2) Kotani H, Sudo K, Naoki H, Fujiwara H, Hayakawa T, Iketani O, Yamaguchi M, Mochizuki M, Iwata S, Kato S. (2016) Possible involvement of distinct phylogenetic clusters of HIV-1 variants in the discrepancies between coreceptor tropism predictions based on viral RNA. Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences. DOI: [10.1186/s40780-016-0065-4](https://doi.org/10.1186/s40780-016-0065-4)
- 3) Ikeno R, Yamada E, Yamazaki S, Ueda T, Nagata M, Takagi R, Kato S. (2017) Factors contributing to salivary human immunodeficiency virus type-1 levels measured by a Poisson distribution-based PCR method. Journal of International Medical Research. DOI: [10.1177/0300060517728652](https://doi.org/10.1177/0300060517728652). e-pub: November 9, 2017
- 4) 加藤真吾. (2017) 1.1 免疫の特徴. 1.2 免疫担当細胞と器官. 臨床免疫検査技術教本:2-11
- 5) Yamada E, Takagi R, Tanabe Y, Fujiwara H, Naoki H, Kato S. (2016) Plasma and

saliva concentrations of abacavir, tenofovir, darunavir and raltegravir in HIV-1-infected patients. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. DOI: [10.5414/CP202789](https://doi.org/10.5414/CP202789). e-pub: April 21, 2017

- 6) Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Ichiro Itoda, Shinya Iwamuro, Yukihiko Yoshimura, Natsuo Tachikawa, Yoko Kojima, Haruyo Mori, Hiroshi Fujiwara, Naoki Hasegawa, Shingo Kato. (2018) Comparative evaluation of the Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population. PLoS One. 13(10):e0198924. doi: [10.1371/journal.pone.0198924](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924). eCollection . Oct 31, 2018.

2. 学会発表

- 1) 岡崎玲子, 加藤真吾, 吉村和久ら. 国内新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 2) 小谷宙, 加藤真吾, 長谷川直樹ら. NRTI にラルテグラビルおよびダルナビルを含む強化療法を導入した 2 症例. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 3) 丸山理恵, 加藤真吾ら. 乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA 検出法. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 4) 矢永由里子, 加藤真吾ら. 「病院に HIV 検査実施ガイドライン」作成と評価分析について. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 5) 近藤真規子, 加藤真吾ら. 中国の MSM 間で大流行している HIV-1 CRF01_AE variant の日本国内への拡散. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 6) 星野慎二, 加藤真吾ら. 全国保健所における

- 梅毒検査体制のアンケート調査. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
- 7) 須藤弘二, 加藤真吾ら. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2015). 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
 - 8) 加藤真吾, 長谷川直樹ら. CDC が推奨する HIV 検査手順の検討と HIV-1/2 鑑別検査キット Geenius の検討. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
 - 9) 佐野貴子, 加藤真吾, 市川誠一ら. HIV 検査・相談マップを用いた HIV 検査相談施設の情報提供およびサイト利用状況の解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 2016 年 11 月.
 - 10) 佐野貴子, 近藤真規子, 加藤真吾ら. 新規 HIV 抗体確認検査試薬である Geenius HIV Confirmatory Assay の検討. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 11) 川畑拓也, 小島洋子, 加藤真吾ら. 新しい HIV 確認検査試薬 Geenius™ の性能評価. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 12) 吉田繁, 加藤真吾, 吉村和久ら. 2016 年度 HIV 薬剤耐性検査外部精度評価の報告. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 13) 岡崎玲子, 加藤真吾, 吉村和久ら. 国内新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 14) 近藤真規子, 加藤真吾, 吉村和久ら. 日本で流行する HIV-1 CRF01_AE と周辺アジア諸国における流行株との関連. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 15) 佐野貴子, 加藤真吾, 今井光信ら. 保健所等公的検査機関を対象とした HIV 検査相談体制に関するアンケート調査. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 16) 丸山理恵, 須藤弘二, 加藤真吾ら. 乾燥濾紙血を用いた HIV-1 RNA および DNA 検査法. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 17) 須藤弘二, 佐野貴子, 加藤真吾ら. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2016). 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京都, 2017 年 11 月.
 - 18) K. Sudo, T. Sano, M. Kondo, T. Kawahata, S. Kato, et al. Comparative Evaluation of the Bio-Rad Geenius™ HIV-1/2 Confirmatory Assay and the New LAV Blot 1 and 2 in the Japanese Population. 28th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Guangzhou(広州), China, 2017.
 - 19) 須藤弘二, 佐野貴子, 近藤真規子, 今井光信, 今村顕史, 加藤真吾. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度調査(2017). 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
 - 20) 近藤真規子, 佐野貴子, 長島真美, 貞升健志, 川畑拓也, 加藤真吾, 今村顕史. 全国地方衛生研究所における HIV 検査実施状況. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
 - 21) 土屋菜歩, 佐野貴子, 近藤真規子, 堅多敦子, 石丸雄二, 城所敏英, カエベタ亜矢, 川畑拓也, 貞升健志, 須藤弘二, 加藤真吾, 大木幸子, 今井光信, 今村顕史. 保健所・検査所における梅毒検査実施状況および陽性率に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
 - 22) 小谷宙, 加藤真吾, 親泊あいみ, 須藤弘二, 丸山理恵, 西松直美, 宇野俊介, 上叢義典,

藤原宏, 長谷川直樹. 準完全長プロウイルスによる治療効果の新しい評価. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.

- 23) 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 佐藤かおり, 豊嶋崇徳, 佐々木悟, 伊藤俊広, 林田庸総, 岡慎一, 湯永博之, 古賀道子, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 椎野禎一郎, 須藤弘二, 加藤真吾, 谷口俊文, 猪狩英俊, 寒川整, 加藤英明, 石ヶ坪良明, 中島秀明, 吉野友祐, 太田康男, 茂呂寛, 渡邊珠代, 松田昌和, 重見麗, 岩谷靖雅, 横幕能行, 渡邊大, 小島洋子, 森治代, 藤井輝久, 高田清式, 南留美, 山本政弘, 松下修三, 健山正男, 藤田次郎, 杉浦互, 吉村和久, 菊池正. 国内新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV-1 の動向. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 24) 丸山理恵, 加藤真吾. HIV RNA と DNA の混合物から RNA を選択的に増幅する RT-PCR 法の開発. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 25) 本田徹郎, 久慈直昭, 丸山理恵, 須藤弘二, 加藤真吾. 健康な HIV 陽性男性が陰性女性との間に子供を持つために: 洗浄精子を用いた顕微授精について. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 26) 土屋菜歩, 佐野貴子, 近藤真規子, 堅多敦子, 石丸雄二, 城所敏英, カエベタ亜矢, 川畑拓也, 貞升健志, 須藤弘二, 加藤真吾, 大木幸子, 今井光信, 今村顕史. 保健所・検査所における HIV 検査・相談実施状況および陽性率に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.
- 27) 佐野貴子, 近藤真規子, 須藤弘二, 今井光信, 加藤真吾, 今村顕史. 民間検査センターにおける HIV 検査実施状況に関するアンケート調査. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会,

大阪府, 2018 年 12 月.

- 28) 川畑拓也, 井戸田一朗, 小島洋子, 近藤真規子, 貞升健志, 佐野貴子, 須藤弘二, 高田昇, 長島真美, 森治代, 加藤真吾, 今村顕史. エビデンスに基づいた専門職向け HIV 検査 Q&A 集の作成. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪府, 2018 年 12 月.

G.知的所有権の取得状況

なし

図1

Geenius HIV1/2 Confirmatory assay: 操作方法

[Geenius cassette]



- ① Serum/Plasma : 5 μ l into well 1
Whole Blood : 15 μ l into well 1

Buffer : 2 Drop into well 1

Wait 5 minutes

- ② Buffer : 5 Drop into well 2

Wait 20 minutes

[Geenius reader and Notebook]

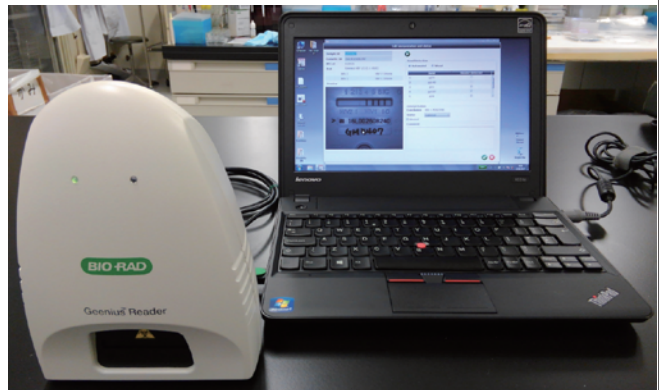
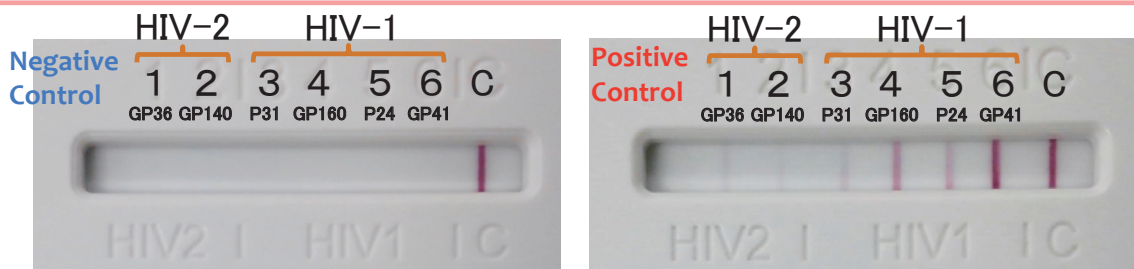


図2

Geenius HIV1/2 Confirmatory assay: 結果判定



line	Band		判定	判定基準
1	HIV-2	GP36: env	測定系の確認	コントロールバンドが出現しなければならない
2	HIV-2	GP140: env		
3	HIV-1	P31: pol (integrase)	HIV陰性	HIV-1とHIV-2のバンドが出現しない
4	HIV-1	GP160: env	HIV-1 陽性	少なくとも1本のENVバンド(GP160またはgp41)を含んだ、少なくとも2つのHIV-1バンドが出現する
5	HIV-1	P24: gag	HIV-2 陽性	GP140とGP36のHIV-2バンドが両方出現する
6	HIV-1	GP41(group M & O)		
C	control	Protein A	判定保留	HIV-1またはHIV-2陽性基準と一致しないHIV-1またはHIV-2バンドの存在

図3

Geenius測定結果(HIV-1陽性)

<HIV-1陽性検体例>

Geenius		WB-1			WB-2		
		陽性	判定保留	陰性	陽性	判定保留	陰性
HIV-1 POSITIVE	107	104	3	0	12	92	3
HIV-1 INDETERMINATE	4	0	4	0	0	2	2
HIV-2 INDETERMINATE	0	0	0	0	0	0	0
HIV NEGATIVE	2	0	0	2	0	0	2

図4

WB-1陽性, WB-2陽性 12例

sample	PA			HIV-1RNA copies/ml	WB-1	WB-2	Geenius						判定
	HIV-1	HIV-2	HIV-1/2				HIV-2		HIV-1				
							gp36	gp140	p31	gp160	p24	gp41	
GM4364	102400	—	102400	4900	+	+	—	—	+	+	+w	+	HIV-1 POSITIVE
GM4366	51200	—	51200	200	+	+	—	—	+	+	+	+	HIV-1 POSITIVE
GM4369	51200	10	25600	20000	+	+	—	—	+	+	+w	+	HIV-1 POSITIVE
GM4351	204800	—	51200	17000	+	+	—	—	+w	+	+w	+	HIV-1 POSITIVE
GM4348	25600	10	51200	1100	+	+	—	—	+	+	+w	+	HIV-1 POSITIVE
GM4349	409600	—	204800	30000	+	+	—	—	+	+	—	+	HIV-1 POSITIVE
GM4370	51200	10	51200	4500	+	+	—	—	+	+	—	+	HIV-1 POSITIVE
GM4322	51200	—	51200	590	+	+	—	—	+	+	+	+	HIV-1 POSITIVE
GM4324	25600	—	25600	4300	+	+	—	—	+w	+	+w	+	HIV-1 POSITIVE
GM4372	51200	—	51200	12000	+	+	—	—	+	+	—	+	HIV-1 POSITIVE
GM4384	204800	—	204800	30000	+	+	—	—	+	+	+w	+	HIV-1 POSITIVE
Y242-3	256000	6400	128000	2900	+	+	+	—	+	+	+	+	HIV-1 POSITIVE

図5

WB-1判定保留7例、陰性2例

sample	PA			HIV-1RNA copies/ml	WB-1	WB-2	Geenius						判定
	HIV-1	HIV-2	HIV-1/2				HIV-2		HIV-1				
				gp36			gp140	p31	gp160	p24	gp41		
GM4346	1280	—	640	1200	±	±	—	—	—	+	+	+	HIV-1 POSITIVE
GM4334	64	—	1024	3.3×10 ⁶	±	±	—	—	—	+w	—	+w	HIV-1 POSITIVE
GM4386	80	—	1280	1200	±	±	—	—	—	+w	—	+w	HIV-1 POSITIVE
GM4327	—	—	64	2300	±	—	—	—	—	—	—	+w	HIV-1 INDETERM INATE
GM4336	128	—	256	3.3×10 ⁵	±	—	—	—	—	—	—	+w	HIV-1 INDETERM INATE
GM4373-1	—	—	512	7.5×10 ⁵	±	±	—	—	—	+w	—	+w	HIV-1 INDETERM INATE
PP034	ND	ND	ND	ND	±	±	—	—	—	—	—	+	HIV-1 INDETERM INATE
GM4373-0	—	—	—	2.8×10 ⁷	—	—	—	—	—	—	—	—	HIV NEGATIVE
Y824	—	—	—	1.7×10 ⁶	—	—	—	—	—	—	—	—	HIV NEGATIVE

図6

Geenius測定結果(HIV陰性)

< HIV陰性検体130例 >

Geenius		WB-1			WB-2		
		陽性	判定 保留	陰性	陽性	判定 保留	陰性
HIV POSITIVE	0	0	0	0	0	0	0
HIV-1 INDETERMINATE	1	0	0	1	0	0	1
HIV-2 INDETERMINATE	1	0	0	1	0	1	0
HIV NEGATIVE	128	0	24	104	0	12	116

図7

HIV迅速スクリーニング検査試薬

抗体検査試薬

ダイナスクリーン・HIV-1/2

(アリーアメディカル 承認1998年)

抗原抗体検査試薬

エスプライン HIV Ag/Ab (富士レビオ 承認2008年)

ダイナスクリーン・HIV Combo

(アリーアメディカル 承認2015年)

図8

ダイナスクリーン試薬

ダイナスクリーン・HIV-1/2



抗体検査法

ダイナスクリーン・HIV Combo



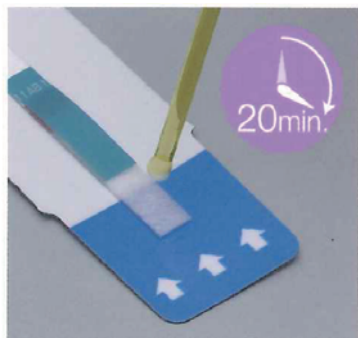
抗原抗体
同時検査法

検出項目	HIV-1抗体、HIV-2抗体	HIV-1抗体、HIV-2抗体、 HIV-1 p24抗原
検体	血清、血漿、全血	血清、血漿、全血
血液検体量	50 μ L	50 μ L
反応時間	15分(～1時間)	20分(～40分)
判定ライン	赤色	赤色

図9

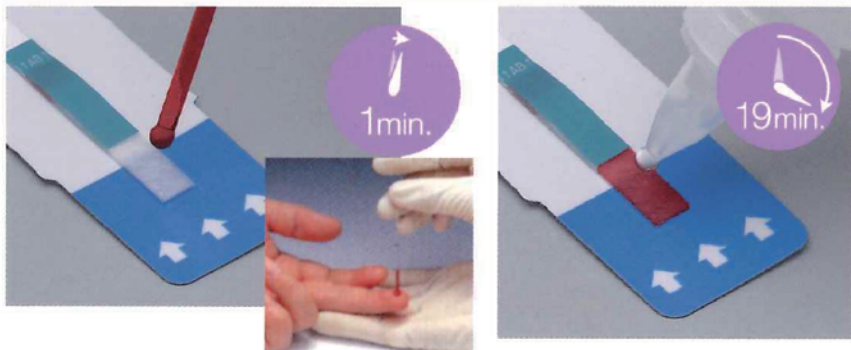
ダイナスクリーン・HIV Combo 操作法

血清・血漿



50µLを検体滴下部に滴下後、20分間静置し判定

全血



50µLを検体滴下部に滴下し染み込むまで1分間静置

1分後、全血展開液を1滴滴下し、19分間静置

図10

ダイナスクリーン・HIV Combo 判定法

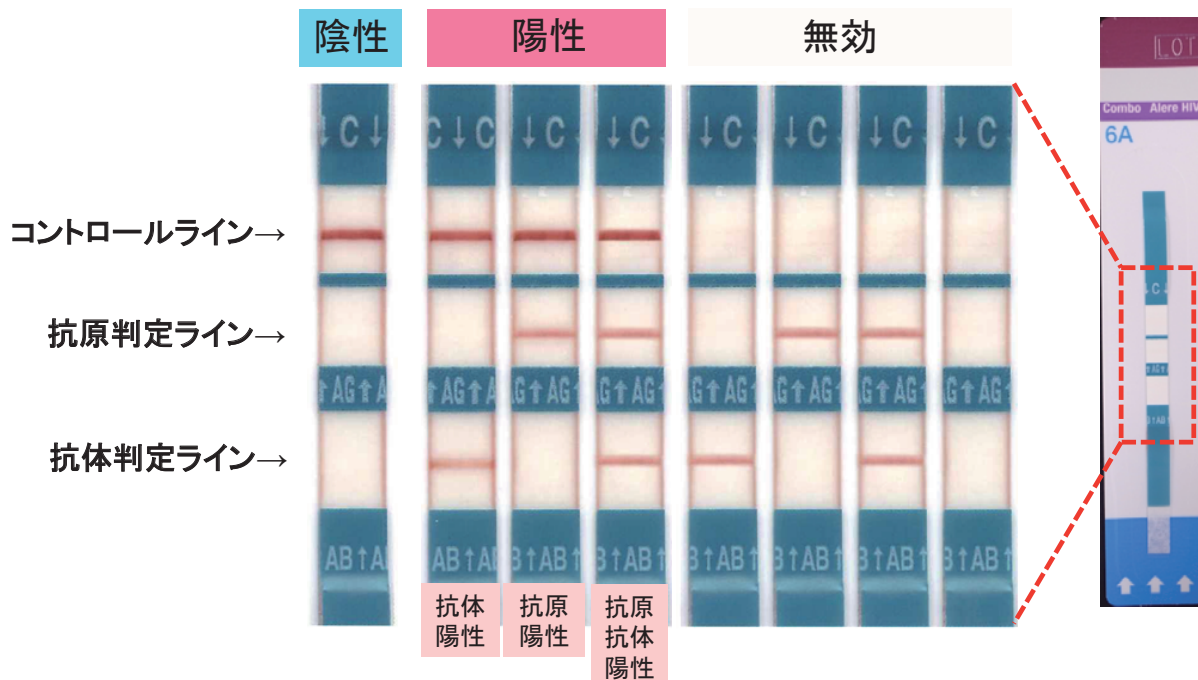


図11

ダイナスクリーン測定結果(血漿)

(2017年2月28日現在)

血漿	ダイナスクリーン・HIV-1/2		ダイナスクリーン・HIV Combo			
	陽性	陰性	Agのみ 陽性	Ag/Ab 陽性	Abのみ 陽性	陰性
HIV陽性検体 30例	29	1	1*	2**	27	0
HIV陰性検体 229例	0	229	1	0	0	228
DS・HIV-1/2 偽陽性 6例	6	0	0	0	1	5
DS・Combo 偽陽性 1例	0	1	0	0	1	0

* HIV-1 RNA 1,700,000 c/mL ** 350,000 c/mL
 ** 30,000 c/mL

図12

ダイナスクリーン測定結果(全血)

(2017年2月28日現在)

全血	ダイナスクリーン・HIV-1/2		ダイナスクリーン・HIV Combo			
	陽性	陰性	Agのみ 陽性	Ag/Ab 陽性	Abのみ 陽性	陰性
HIV陽性検体 21例	21	0	0	1*	20	0
HIV陰性検体 204例	0	204	0	0	0	204
DS・HIV-1/2 偽陽性 1例	1	0	0	0	0	1

* HIV-1 RNA 150,000 c/mL

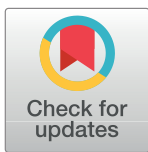
RESEARCH ARTICLE

Comparative evaluation of the Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population

Makiko Kondo¹, Koji Sudo², Takako Sano¹, Takuya Kawahata³, Ichiro Itoda⁴, Shinya Iwamuro⁵, Yukihiko Yoshimura⁶, Natsuo Tachikawa⁶, Yoko Kojima³, Haruyo Mori³, Hiroshi Fujiwara⁷, Naoki Hasegawa⁷, Shingo Kato^{2*}

1 Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Chigasaki, Kanagawa, Japan, **2** Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, **3** Virology Section, Division of Microbiology, Osaka Institute of Public Health, Osaka, Osaka, Japan, **4** Shirakaba Clinic, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, **5** Atsugi City Hospital, Atsugi, Kanagawa, Japan, **6** Department of Infectious Diseases, Yokohama Municipal Citizen's Hospital, Yokohama, Kanagawa, Japan, **7** Center for Infectious Diseases and Infection Control, Keio University Hospital, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

* skato@a3.keio.jp



OPEN ACCESS

Citation: Kondo M, Sudo K, Sano T, Kawahata T, Itoda I, Iwamuro S, et al. (2018) Comparative evaluation of the Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population. PLoS ONE 13(10): e0198924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924>

Editor: Hiroshi Nishiura, Hokkaido University Graduate School of Medicine, JAPAN

Received: May 26, 2018

Accepted: October 17, 2018

Published: October 31, 2018

Copyright: © 2018 Kondo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This research was supported by a Grant-in-Aid for AIDS research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H28-AIDS-001), (<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000103641.html>). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Accurate diagnosis of earlier HIV infection is essential for treatment and prevention. Currently, confirmation tests of HIV infection in Japan are performed using Western blot (WB), but WB has several limitations including low sensitivity and cross-reactivity between HIV-1 and HIV-2 antibodies. To address these problems, a new HIV testing algorithm and a more reliable confirmation and HIV-1/2 differentiation assay are required. The Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Confirmatory Assay (Geenius) has recently been approved and recommended for use in the revised guidelines for diagnosis of HIV infection by the Center for Disease Control and Prevention (USA). We made comprehensive comparison of the performance of Geenius and the Bio-Rad NEW LAV BLOT 1 and 2 (NLB 1 and 2) which are WB kits for HIV-1 and HIV-2, respectively, to examine if Geenius is a suitable alternative to these WB assays which are now being used in HIV testing in Japan. A total of 166 HIV-1 positive samples (146 from patients with established HIV-1 infection and 20 from patients with acute infection), five HIV-1 seroconversion panels containing 21 samples and 30 HIV-2 positive samples were used. In addition, a total of 140 HIV negative samples containing 10 false-positives on screening tests were examined. The sensitivity of Geenius and NLB 1 for HIV-1 positive samples was 99.3% and 98.6%, respectively. Geenius provided more positive results in the samples from acute infections and detected positivity 0 to 32 days earlier in seroconversion panels than NLB 1. NLB 2 gave positive results in 12.3% of HIV-1 positive samples. The sensitivity of both Geenius and NLB 2 for HIV-2 positive samples was 100%. The specificity of Geenius, NLB 1 and NLB 2 was 98.5%, 81.5% and 90.0%, respectively. Geenius is an attractive alternative to WB for confirmation and differentiation of HIV-1 and HIV-2 infections. The adaptation of Geenius to the HIV testing algorithm may be advantageous for rapid diagnosis and the reduction of testing costs.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The risk of HIV transmission during acute and early infection is much higher than that during established infection [1]. Furthermore, early initiation of antiretroviral therapy (ART) substantially reduces the risk of transmission to sexual partners [2] and improves clinical outcomes, compared with delayed ART [3]. Accurate diagnosis of earlier HIV infection is important for treatment and prevention strategies.

Currently, diagnosis of HIV infection in Japan is carried out mainly in two different algorithms: (i) a sample tested positive on HIV-1/2 antigen/antibody assay is retested with HIV-1 Western blot (WB-1) and HIV-2 Western blot (WB-2) simultaneously, and then, if the results on both assays are negative, applied to nucleic acid test (NAT) of HIV-1 plasma RNA; this algorithm is recommended by the National Institute of Infectious Diseases (Japan) [4]; (ii) a sample that tested positive on HIV-1/2 antigen/antibody assay is then retested with WB-1 and NAT at the same time, and then, if the results on both assays are negative, applied to WB-2; this is recommended by the Japanese Society for AIDS Research [5]. These algorithms, however, have several limitations associated with Western blot that include false negative or indeterminate results in the early phase, cross-reactivity between HIV-1 and HIV-2 [6], and a labor-intensive and time-consuming protocol.

In 2014, the Center for Disease Control and Prevention (CDC) in the US published revised guidelines for diagnosis of HIV infection in which the use of an HIV-1 and HIV-2 antibody differentiation assay is recommended after a repeatedly reactive HIV-1/2 antigen/antibody test [7]. The FDA-approved Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test (Bio-Rad Laboratories) was initially validated for this purpose. Thereafter, Bio-Rad developed a new confirmatory and differentiation test, the Geenius HIV-1/2 Confirmatory Assay (hereafter called Geenius). Geenius received a CE mark in February 2013 and clearance from the Food and Drug Administration in October 2014. Although Geenius has been evaluated in many studies [8–17], there have been few studies on comparison between Geenius and WB. Moon et al. compared the performance of Geenius and WB-1 [16] but did not test WB-2, and thus they did not comparatively evaluate the HIV-1/2 differentiation ability of Geenius and WB-1/WB-2.

In Japan, while Geenius has not been approved yet, there is a growing interest in the CDC-recommended HIV diagnostic algorithm because it is expected to decrease the number of indeterminate results, allow earlier identification of HIV infections, and reduce the number of NAT to resolve the ambiguity of WB results.

The aims of this study are to compare the confirmation and differentiation performance of Geenius and NEW LAV BLOT 1 and 2 (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan, hereafter called NLB 1 and 2), which are WB-1 and WB-2 kits, respectively, and to examine if Geenius is a suitable alternative to WB in the HIV testing algorithm in Japan.

Material and methods

Approval was obtained from the Ethics Committee of the Keio University School of Medicine (20150176)

Samples and patients

A total of 166 HIV-1 positive samples were used: 146 were obtained from patients with established HIV-1 infection and 20 from patients with acute infection. Among the patients with established infection, 73 were obtained from patients receiving ART at the Keio University Hospital or Atsugi City Hospital and had been diagnosed with HIV-1 infection by either of Dainascreen HIV Combo (an HIV-1 p24 Ag/HIV-1/2 Ab immunochromatographic test,

Alere Medical, Tokyo, Japan) or the Architect HIV Ag/Ab Combo Assay (an automated HIV-1 p24 Ag/HIV-1/2 Ab test, Abbott Japan, Chiba, Tokyo), followed by NLB 1 and 2 and, if necessary, the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test (an automated qualitative HIV-1 RNA test, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan, hereafter called Cobas). The other 93 samples were obtained from individuals seeking HIV testing in public health centers located in Kanagawa and Osaka: 85 were positive on Dainascreen HIV Combo and 8 were positive on the Architect HIV Ag/Ab Combo Assay. Their infections were confirmed by NLB 1 and 2 or Cobas. Established HIV-1 infection was defined by positive results on both NLB 1 and Cobas; acute HIV-1 infection was defined by an indeterminate or negative result on NLB 1 but a positive Cobas result.

Five HIV-1 seroconversion panels comprised of seven, five, four, three and two samples, respectively, were obtained from patients attending the Shirakaba Clinic in Tokyo, Japan.

Thirty samples of two commercially obtained HIV-2 panels were used: five from HIV-2 Mixed Titer AccuSet Performance Panel (PRE301B, SeraCare Life Sciences, Millford, MA) and 25 from Plasma-CPD-A Anti HIV-2 (HemaCare, Los Angeles, CA).

A total of 140 HIV negative samples were obtained from individuals seeking HIV testing in the public health centers, which were tested as mentioned above; 10 of them were false-positive on screening tests using Dainascreen HIV Combo, which were negative or indeterminate on NLB 1 and 2, and negative on Cobas.

Comparative testing by Geenius and NLB 1 and 2 was conducted between May 2016 and April 2017 in Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Osaka Institute of Public Health, and Keio University School of Medicine according to the manufacturer's instructions.

The donors at Keio University, Atsugi City Hospital, and the Shirakaba Clinic provided written informed consent; the donors in the public health centers provided verbal informed consent. All data were fully anonymized during the analysis.

Geenius

Geenius is a single-use immunochromatographic test for the confirmation and differentiation of individual antibodies to HIV-1 and HIV-2 in whole blood, serum or plasma samples using HIV synthetic peptides or recombinant proteins for HIV-1 (p31 [POL], gp160 [ENV], p24 [GAG] and gp41 [ENV]) and HIV-2 (gp36 [ENV] and gp140[ENV]). Geenius is aimed at confirming the presence of antibodies to HIV-1 and HIV-2 in samples reactive by screening tests. Banding patterns and intensities on a Geenius cassette were read by an automated reader connected to a personal computer and interpreted using the Geenius algorithm. This cartridge assay allows rapid evaluation within 30 min. Interpretive results involve HIV negative, HIV-2 indeterminate, HIV-1 indeterminate, HIV indeterminate, HIV-1 positive, HIV-2 positive, HIV-2 positive (with HIV-1 cross-reactivity), and HIV positive untypable.

NLB 1 and 2

NLB 1 and 2 are the only WB kits approved by The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) of Japan for confirmation of HIV-1 and HIV-2 infection, respectively. Bands were observed visually. Interpretation of banding patterns is performed as follows: for HIV-1, the presence of at least two of three ENV bands (GP160, GP120 and GP41) is considered positive, no HIV-1 specific band negative, and other patterns indeterminate; for HIV-2, the presence of one ENV, one GAG and one POL band is considered positive, no HIV-2 specific band negative, other patterns indeterminate.

Statistics

Sensitivity and specificity were determined by considering indeterminate results as not positive and not negative, respectively, with 95% confidence interval [95% CI]. Cohen’s kappa (κ) was calculated to assess agreement between Geenius and NLB 1.

Results

Samples in established HIV-1 infection

Geenius, NLB 1, and NLB 2 results on 146 samples from patients with established HIV-1 infection are compared in Table 1. Geenius provided 145 HIV-1 positive results including one HIV positive untypable (sensitivity, 99.3% [95% CI, 96.2–100.0]) and one HIV-1 indeterminate result. NLB 1C showed 144 positive result (sensitivity, 98.6% [95% CI, 95.1–99.8]) and two indeterminate results: the indeterminate results were observed on samples from patients receiving ART. It is notable that only four samples were negative by NLB 2, which may be due to high cross-reactivity.

Samples in acute HIV-1 infection

Geenius, NLB 1, and NLB 2 results on 20 samples from patients with acute HIV-1 infection are compared in Table 1. Geenius reclassified seven of the NLB 1 indeterminate samples as positive, showing that Geenius has a higher detection sensitivity than NLB 1.

Seroconversion panels

Five HIV-1 seroconversion panels were used to compare the detection ability of identifying positive samples during the early phase of infection between Geenius and NLB 1 (Table 2).

Table 1. Comparison of Geenius with NLB 1 and 2 results for established and acute HIV-1 infection samples.

	WB		Geenius						Total
			HIV-1 positive	HIV-1 indeterminate	HIV-2 positive	HIV-2 indeterminate	HIV positive untypable	HIV negative	
Established HIV-1 Infection ^a (n = 146)	NLB 1	Positive	143	0	0	0	1	0	144
		Indeterminate	1 ^c	1 ^c	0	0	0	0	2
		Negative	0	0	0	0	0	0	0
		Total	144	1	0	0	1	0	146
	NLB 2	Positive	18	0	0	0	0	0	18
		Indeterminate	122	1	0	0	1	0	124
		Negative	4	0	0	0	0	0	4
		Total	144	1	0	0	1	0	146
Acute HIV-1 infection ^b (n = 20)	NLB 1	Positive	0	0	0	0	0	0	0
		Indeterminate	7	6	0	0	0	3	16
		Negative	0	0	0	0	0	4	4
		Total	7	6	0	0	0	7	20
	NLB 2	Positive	0	0	0	0	0	0	0
		Indeterminate	5	3	0	0	0	0	8
		Negative	2	3	0	0	0	7	12
		Total	7	6	0	0	0	7	20

^aFourth-generation enzyme immunoassay positive, NLB 1 positive and NAT positive at the time of initial diagnosis.

^bFourth-generation enzyme immunoassay positive, NLB 1 negative and NAT positive at the time of sample collection

^cOn ART at the time of sample collection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924.t001>

Table 2. Comparison of Geenius with NLB 1 and 2 results for HIV-1 seroconversion panels^a.

Patient	Sample	Days ^b	Geenius		NLB 1 ^d	NLB 2 ^d
			HIV-1 ^c	HIV-2		
A	1	0	Neg	Neg	Neg	Neg
	2	9	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Ind (gp160, p68, p55, p24)	Ind (p26)
	3	16	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Ind (gp160, p68, p55, p40, p31, p24, p18)	Ind (p26)
	4	36	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
	5	42	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
	6	65	Pos (p31, gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
	7	107	Pos (p31, gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
B	1	0	Neg	Neg	Neg	Neg
	2	7	Neg	Neg	Neg	Neg
	3	40	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
	4	47	Pos (p31, gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
	5	85	Pos (p31, gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
C	1	0	Neg	Neg	Neg	Neg
	2	7	Pos (gp160, gp41)	Neg	Ind (gp160, p24)	Neg
	3	39	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
	4	126	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
D	1	0	Neg	Neg	Neg	Neg
	2	7	Ind (gp41)	Neg	Ind (p52, p40, p24, p18)	Ind (p26)
	3	33	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26)
E	1	0	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26, p16)
	2	8	Pos (gp160, p24, gp41)	Neg	Pos	Ind (p26, p16)

^aResults are shown by Pos (positive), Ind (indeterminate) or Neg (negative).

^bTime from collecting the first sample.

^cWhen a result was positive, reactive antigens are shown in parenthesis.

^dWhen a result was indeterminate, reactive antigens are shown in parenthesis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924.t002>

Geenius gave positive results 0 to 32 days earlier than NLB 1. Cross-reactive p26 bands appeared in NLB 2 as the specific HIV-1 antibody titer increased, while no HIV-2-related band was observed in Geenius.

HIV-2 panels

Thirty samples of two commercial HIV-2 panels were used to compare Geenius, NLB 1, and NLB 2 (Table 3). All samples were positive with NLB 2 (sensitivity, 100% [95% CI, 88.4–100.0]); two samples were positive and 28 were indeterminate with NLB 1 (false-positive rate,

Table 3. Comparison of Geenius with NLB 1 and 2 results for HIV-2 panel samples.

		Geenius					Total
		HIV-1 positive	HIV-2 positive	HIV-2 positive with HIV-1 cross-reactivity	HIV positive untypable	HIV negative	
NLB 1	Positive	0	0	2	0	0	2
	Indeterminate	0	10	16	2	0	28
	Negative	0	0	0	0	0	0
	Total	0	10	18	2	0	30
NLB 2	Positive	0	10	18	2	0	30
	Indeterminate	0	0	0	0	0	0
	Negative	0	0	0	0	0	0
	Total	0	10	18	2	0	30

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924.t003>

Table 4. Comparison of Geenius with NLB 1 and 2 results for negative samples by fourth-generation immunoassay (n = 130).

		Geenius						Total
		HIV-1 positive	HIV-1 indeterminate	HIV-2 positive	HIV-2 indeterminate	HIV positive untypable	HIV negative	
NLB 1	Positive	0	0	0	0	0	0	0
	Indeterminate	0	0	0	0	0	24	24
	Negative	0	1	0	1	0	104	106
	Total	0	1	0	1	0	128	130
NLB 2	Positive	0	0	0	0	0	0	0
	Indeterminate	0	0	0	1	0	12	13
	Negative	0	1	0	0	0	116	117
	Total	0	1	0	1	0	128	130

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924.t004>

6.7% [95% CI, 0.8–22.1]). Geenius gave 28 HIV-2 positive and two HIV positive untypable results (sensitivity, 100% [95% CI, 88.4–100.0]).

Seronegative samples

A total of 130 screening negative samples were used to determine the specificity of three assays (Table 4). Concordant negative results between Geenius and NLB 1 were obtained for 104 samples; those between Geenius and NLB 2 for 116 samples. The specificity of Geenius, NLB 1, and NLB 2 were 98.5% (128/130) [95% CI, 94.6–99.8], 81.5% (106/130) [95% CI, 73.8–87.8] and 90.0% (117/130) [95% CI, 83.5–94.6], respectively.

False-positive samples

It is important for a confirmatory assay to discriminate between acute HIV-1 infections and false positive screening results. Ten Dainascreen HIV Combo positive but Cobas negative samples were tested with the three assays (Table 5): eight were negative and two were indeterminate (positive p31 bands) with Geenius; six were negative and four were indeterminate with NLB 1; five were negative and five were indeterminate with NLB 2, suggesting Geenius is the most specific for HIV-1 false-positive screening samples among the three kits.

Concordance

The overall concordance (κ) between Geenius and NLB 1 was 0.78 if positive, indeterminate, and negative results were considered separately, and 0.95 if indeterminate results were considered as negative.

Table 5. Comparison of Geenius with NLB 1 and 2 results for HIV-1 Combo positive but NAT negative samples (n = 10)^a.

Sample.	Geenius ^a		NLB 1	NLB 2
	HIV-1	HIV-2		
1	Negative	Negative	Indeterminate (p18)	Negative
2	Negative	Negative	Indeterminate (p18)	Indeterminate (p26, p16)
3	Negative	Negative	Negative	Negative
4	Negative	Negative	Negative	Negative
5	Negative	Negative	Indeterminate (p24, p18)	Negative
6	Indeterminate (p31)	Negative	Indeterminate (p18)	Indeterminate (p26)
7	Negative	Negative	Negative	Negative
8	Negative	Negative	Negative	Indeterminate (p16)
9	Indeterminate (p31)	Negative	Negative	Indeterminate (p16)
10	Negative	Negative	Negative	Indeterminate (p16)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198924.t005>

Discussion

Japan is a country with low-level HIV epidemics. The cumulative reported incidence of HIV infection through the end of 2016 was 27,443 [18]. Among them, the number of persons with HIV-2 infection was eight [19–22], and there has been no report of HIV-1 and HIV-2 dual infection. According to PMDA, the confirmation of HIV-1 and HIV-2 infections should be performed using WB-1 and WB-2, respectively. However, discrimination between HIV-1 and HIV-2 infections is sometimes very difficult due to cross-reactivity of antibodies against the two viruses. In such cases, it is recommended that the samples are retested from a screening test after several weeks or tested with SERODIA-HIV-1/2 (a particle agglutination assay to detect antibodies to HIV-1 and/or HIV-2, Fujirebio, Tokyo, Japan) or Pepti-LAV 1/2 Assay (an enzyme immunoassay for differentiation of HIV-1 and HIV-2 antibodies, Bio-Rad, Tokyo, Japan) to distinguish HIV-1 and HIV-2 infections, while these differentiation assays also have a high cross-reactivity. A test having a higher HIV-1/2 discrimination ability is required, especially in countries such as Japan where the prevalence of HIV-2 infection is extremely low. In this study, we aimed to assess whether a new rapid test Geenius is an effective alternative to WB-1 and WB-2 for confirmation and discrimination of HIV-1 and HIV-2 infections.

Although the sensitivity of Geenius and NLB 1 was not significantly different (99.3% vs 98.6%) for samples from established HIV-1 infections, Geenius gave seven positive results in 20 NLB 1 negative or indeterminate samples from acute HIV-1 infections and provided positive results earlier than NLB 1 in two of five seroconversion panels, showing that Geenius is more sensitive than NLB 1. For 140 HIV-1 negative samples including 10 false-positive samples, Geenius gave 136 negative and NLB 1 gave 112 negative results, showing that Geenius is more specific than NLB 1.

Cross-reactivity of HIV-1 and HIV-2 antibodies between NLB 1 and NLB 2 was remarkable compared with Geenius. When HIV-1 positive samples were examined, 18 of 144 NLB 1 positive samples were also positive with NLB 2. Geenius, however, resolved all of these double-positive samples as HIV-1 positive. An overall discrimination rate of Geenius was 97.7% (172/176) [95% CI, 94.3–99.4] and that of a combinational use of NLB 1 and NLB 2 was 87.5% (154/176) [95% CI, 81.7–92.0], showing that Geenius has a higher discrimination ability than NLB 1/NLB 2. Geenius still gave three HIV positive untypable results: one in 146 HIV-1 positive samples and two in 20 HIV-2 positive samples. It is practically impossible to determine if these results reflect HIV-1/2 dual infection or cross-reactivity at present because the application of HIV-2 NAT for confirmation of HIV-2 infection has not yet been established.

According to the HIV diagnostic algorithm recommended by CDC, samples that are positive on screening tests but negative or indeterminate on HIV-1/HIV-2 antibody differentiation immunoassay should be tested with an HIV-1 NAT [7]. Because Geenius gave fewer negative or indeterminate results for HIV-1 positive samples and fewer indeterminate results for HIV-1 false-positive samples than NLB 1/NLB 2 (Tables 1, 2 and 5), the use of Geenius will decrease the number of HIV-1 NAT tests (5,200 yen per test) required for unresolved results as compared to the use of NLB 1/NLB 2, which may lead to the reduction of testing costs.

Geenius is characterized by the cassette involving immunochromatographic components to detect HIV-1/2 antibodies and the automated reader using the proprietary interpretive software. These devices make Geenius have several advantages over WB: a protocol of Geenius is simple, easy, and rapid because it consists of dispensing 15 μ L of whole blood to the well of the cassette followed by adding two drops of the provided buffer and takes 30 minutes, while WB has technically demanding multiple steps including antigen-antibody binding, binding with the horseradish peroxidase conjugated secondary antibody, and color development and required several hours; the automated reader allows for the objective evaluation of results,

eliminating subjective interpretations which are required for WB. It is well known that technical skills and interpretation experience are required to perform WB [23, 24]. The rapidity of Geenius may allow HIV testing in public health centers or outreach services to be completed on the same day.

WB is frequently used for estimating the stage of early HIV-1 infections [25], based on the study by Fiebid et al. [26], in which positive WB without p31 band is stage V and positive WB with p31 band is stage VI. In this study, Geenius was shown to confirm HIV-1 seropositivity earlier than WB, and thereafter detect p31 bands in panels A and B (Table 2). Keating et al. [27] demonstrated that additional interpretive analysis of band intensities help estimation of recent infections. Development of such algorithms may contribute to epidemiological studies on HIV infections.

Conclusions

Geenius is an attractive alternative to WB for confirmation and differentiation of HIV-1 and HIV-2 infections. The adaptation of Geenius to the HIV testing algorithm may lead to a more rapid diagnosis and cost reduction.

Acknowledgments

The authors would like to thank Bio-Rad Laboratories (Tokyo, Japan) for the supply of free assay kits.

Author Contributions

Data curation: Ichiro Itoda, Shinya Iwamuro, Yukihiro Yoshimura, Natsuo Tachikawa, Hiroshi Fujiwara, Naoki Hasegawa.

Formal analysis: Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Shingo Kato.

Funding acquisition: Shingo Kato.

Investigation: Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Ichiro Itoda, Shinya Iwamuro, Yukihiro Yoshimura, Natsuo Tachikawa, Yoko Kojima, Haruyo Mori, Hiroshi Fujiwara, Naoki Hasegawa, Shingo Kato.

Methodology: Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Yoko Kojima, Haruyo Mori.

Project administration: Naoki Hasegawa, Shingo Kato.

Resources: Naoki Hasegawa.

Supervision: Shingo Kato.

Validation: Makiko Kondo, Koji Sudo, Takako Sano, Takuya Kawahata, Shingo Kato.

Writing – original draft: Makiko Kondo.

Writing – review & editing: Haruyo Mori, Shingo Kato.

References

1. Miller WC, Rosenberg NE, Rutstein SE, Powers KA. Role of acute and early HIV infection in the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5: 277–282. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833a0d3a> PMID: 20543601.

2. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission. *N Engl J Med*. 2016; 375: 830–839. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600693> PMID: 27424812.
3. Grinztejn B, Hosseinipour MC, Ribaudo HJ, Swindells S, Eron J, Chen YQ, et al. Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 HPTN 052 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14: 281–290. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70692-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70692-3) PMID: 24602844.
4. The National Institute of Infectious Diseases, Japan. Voluntary counseling and testing for the diagnosis of HIV infection: update 2012. Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class5>. Cited 27 February 2018.
5. The Japanese Society for AIDS Research. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: approved guideline 2008. *The Journal of AIDS Research*. 2009; 11: 70–72. Available from: http://jaids.umin.ac.jp/journal/journal_vol11_no01_j.html. Cited 27 February 2018.
6. Guan M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in Western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14: 649–659. <https://doi.org/10.1128/CVI.00393-06> PMID: 17409223.
7. Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendations. 2014. Available from: <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447>. Cited 27 February 2018.
8. Malloch L, Kadivar K, Putz J, Levett PN, Tang J, Hatchette TF, et al. Comparative evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Confirmatory Assay and the Bio-Rad Multispot HIV-1/2 Rapid Test as an alternative differentiation assay for CLSI M53 algorithm-I. *J Clin Virol*. 2016; 58 Suppl 1: e85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.008> PMID: 24342484.
9. Abbate I, Pergola C, Pisciotto M, Sciamanna R, Sias C, Orchi N, et al. Evaluation in a clinical setting of the performances of a new rapid confirmatory assay for HIV1/2 serodiagnosis. *J Clin Virol*. 2014; 61: 166–169. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.015> PMID: 25037532.
10. Hawthorne Hallen A, Samuelson A, Nordin M, Albert J, Bogdanovic G. Evaluation of Bio-Rad Geenius HIV-1 and -2 assay as a confirmatory assay for detection of HIV-1 and -2 antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21: 1192–1194. <https://doi.org/10.1128/CVI.00153-14> PMID: 24943380.
11. Herssens N, Beelaert G, Franssen K. Discriminatory capacity between HIV-1 and HIV-2 of the new rapid confirmation assay Geenius. *J Virol Methods*. 2014; 208: 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.025> PMID: 25075934.
12. Montesinos I, Eykmans J, Delforge ML. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 test as a confirmatory assay. *J Clin Virol*. 2014; 60: 399–401. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.025> PMID: 24932737.
13. Mor O, Mileguir F, Michaeli M, Levy I, Mendelson E. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/2 assay as an alternative to the INNO-LIA HIV 1/2 assay for confirmation of HIV infection. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 2677–2679. <https://doi.org/10.1128/JCM.01184-14> PMID: 24789189.
14. Tinguely C, Schild-Spycher T, Bahador Z, Gowland P, Stolz M, Niederhauser C. Comparison of a conventional HIV 1/2 line immunoassay with a rapid confirmatory HIV 1/2 assay. *J Virol Methods*. 2014; 206: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.05.010> PMID: 24877900.
15. Friedrichs I, Buus C, Berger A, Keppler OT, Rabenau HF. Evaluation of two HIV antibody confirmatory assays: Geenius™ HIV1/2 Confirmatory Assay and the recomLine HIV-1 & HIV-2 IgG Line Immunoassay. *J Virol Methods*. 2015; 224: 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.015> PMID: 26315319.
16. Moon HW, Huh HJ, Oh GY, Lee SG, Lee A, Yun YM, et al. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/2 confirmation assay as an alternative to Western blot in the Korean population: a multi-center study. *PLoS One* 2015; 10: e0139169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139169> PMID: 26422281.
17. Fordan S, Bennett B, Lee M, Crowe S. Comparative performance of the Geenius™ HIV-1/HI-2 supplemental test in Florida's public health testing population. *J Clin Virol*. 2017; 91: 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.04.005> PMID: 28434810.
18. The committee of AIDS surveillance, the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The annual AIDS surveillance report 2016, Japan. Available from: http://api-net.jfap.or.jp/status/2016/16nenpo/16nenpo_menu.html. Cited 5 March 2018.
19. Kusagawa S, Imamura Y, Yasuoka A, Hoshino H, Oka S, Takebe Y. Identification of HIV type 2 subtype B transmission in East Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003; 19: 1045–1049. <https://doi.org/10.1089/088922203322588413> PMID: 14686325.
20. Kawahata T, Kojima Y, Mori H, Otake T, Koh KR, Hino M. First identification of a foreign resident with HIV-2 infection in Japan. *Infectious Agents Surveillance Report*. 2004; 25: 335.

21. Utsumi T, Nagakawa H, Uenishi R, Kusakawa S, Takebe Y. An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years. *AIDS*. 2007; 21: 1834–1835. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32827b1477> PMID: 17690592.
22. Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, et al. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Def Syndr*. 2010; 54: 241–247. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181dc98c1> PMID: 20502347.
23. Sato PA, Maskill WJ, Tamashiro H, Heymann DL. Strategies for laboratory HIV testing: an examination of alternative approaches not requiring Western blot. *Bull World Health Organ*. 1994; 72: 129–134. PMID: 8131248.
24. Branson BM, Ginocchio CC. Introduction to 2013 Journal of Clinical Virology supplement on HIV testing algorithm. *J. Clin Virol*. 2013; 585: e1. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.026> PMID: 24342467.
25. Ananworanich J, Phanuphak N, de Souza M, Paris R, Arroyo M, Trichavaroi R, et al. Incidence and characterization of acute HIV-1 infection in a high-risk Thai population. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008; 49: 151–155. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e318183a96d> PMID: 18769355.
26. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*. 2003; 5: 1871–1879. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000076308.76477.b8> PMID: 12960819.
27. Keating SM, Kassanje R, Lebedeva M, Facente SN, MacArthur JC, Grebe E, et al. Performance of the Bio-Rad Geenius HIV1/2 Supplemental Assay in detecting “recent” HIV infection an calculating population incidence. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 73: 581–588. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001146> PMID: 27509247.