

Received: 2011.01.10
Accepted: 2011.03.11
Published: 2011.03.25

Czynniki wpływające na zakaźność HIV

Influence of different physical conditions on HIV infectivity

Jacek Gąsiorowski^{1,2,3}, Łukasz Łapiński^{4,5}, Brygida Knysz^{2,3}

¹ Samodzielna Pracownia Monitorowania Zakażeń u Osób Uzależnionych, Katedra Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

² Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

³ Poradnia Profilaktyczno-Lecznicza, Wrocławskie Centrum Zdrowia

⁴ Punkt Konsultacyjno-Diagnostyczny, Wrocławskie Centrum Zdrowia

⁵ Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Dotąd nie udało się jeszcze określić jednoznacznie granicznych warunków fizycznych, w jakich HIV przestaje być zakaźny dla komórek ludzkich. Do utraty zdolności wirusa do zakażenia nie jest konieczna jego całkowita inaktywacja – często wystarczy uszkodzenie mechanizmów warunkujących, np. wnikanie HIV do komórki lub jego wbudowywanie się w DNA gospodarza. Dlatego też stwierdzenie obecności materiału genetycznego – HIV-RNA w badanej próbce podanej działaniu określonego czynnika nie musi oznaczać, że wiriony nadal są zdolne do zakażenia. Na zdolność wirusa do zachowania zakaźności w określonych warunkach wpływają m.in. temperatura, wilgotność, nasłonecznienie, ciśnienie, pH środowiska, obecność środków odkażających, substancji hamujących krzepnięcie, rodzaj i ilość zakaźnego materiału biologicznego, a zwłaszcza liczba kopii HIV-RNA. Obecnie najlepiej poznano wpływ wysokiej temperatury na zakaźność, dezaktywację wirusa oraz liczbę kopii HIV-RNA, natomiast wpływ niskiej temperatury na te parametry został zdecydowanie słabiej zbadany. W pracy autorzy przedstawili wpływ różnych czynników na zakaźność HIV, ze szczególnym uwzględnieniem różnych wartości temperatury.

Słowa kluczowe:

HIV • zakażenie • zakaźność • inaktywacja

Summary

To date it has been impossible to establish borderline physical conditions which prevent HIV from infecting human cells. Full inactivation of the virus is not necessary to lose its capacity for infection – often damage of the mechanisms concerning e.g. HIV entry into the cell or integration with host DNA is sufficient. The presence of HIV RNA in a sample under certain conditions does not mean that the virions are infectious. Viral infectivity under certain conditions depends on temperature, humidity, sunlight, atmospheric pressure, pH of the environment, disinfectants, coagulation inhibitors, and the kind and amount of infectious biological material, especially HIV viremia in it. At present the influence of high temperature on HIV infectivity, inactivation or HIV RNA level is the best known phenomenon, while the influence of low temperature on the above parameters has been examined in less detail. In the paper the authors present the influence of various parameters on HIV infectivity, especially temperature variation.

Key words: HIV • infection • infectivity • inactivation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=936097>

Word count: 2338

Tables: –

Figures: –

References: 22

Adres autora: dr Łukasz Łapiński, Poradnia Terapii Uzależnień od Substancji Psychoaktywnych, ul. Podwale 7, 50-043 Wrocław; e-mail: llapin@farmklin.am.wroc.pl

HIV wyizolowano z materiału biologicznego ponad 20 lat temu. Od kilkunastu lat znana jest jego struktura. Mimo to, do dnia dzisiejszego nie udało się określić jednoznacznie granicznych warunków fizycznych, w jakich przestaje on być zakaźny dla komórek ludzkich. Zwłaszcza, że do utraty zdolności wirusa do zakażenia nie jest konieczna jego całkowita inaktywacja – często wystarczy uszkodzenie mechanizmów warunkujących, np. wnikanie HIV do komórki lub też jego wbudowywanie się w DNA gospodarza. Dlatego też stwierdzenie obecności HIV lub jego materiału genetycznego – RNA w badanej próbce poddanej działaniu określonego czynnika wcale nie musi oznaczać, że wiriony nadal są zdolne do zakażenia. Podobnie brak spadku stężenia HIV RNA nie jest równoznaczny z tym, że badany czynnik nie zmniejsza zakaźności wirusa – moment utraty zdolności wirionów do zakażenia komórek ludzkich znacznie poprzedza zmniejszenie poziomu wirerii [1,3,10,14,18,21].

Przyczyny braku określenia precyzyjnie czynników powodujących utratę zakaźności HIV lub jego całkowitą inaktywację należy upatrywać w ograniczeniach metodologicznych dotychczas przeprowadzonych doświadczeń, a także w skomplikowanej biologii samego wirusa. W większości dotychczas przeprowadzonych doświadczeń badano jedynie wpływ pojedynczego czynnika na zakaźność lub inaktywację wirusa, pomijając inne, mogące w istotny sposób wpływać na wirulencję HIV. Wiadomo jednak, że na zdolność wirusa do zachowania zakaźności w określonych warunkach wpływa wiele czynników – często zmiana jedynie jednego z nich może decydować o odmiennym wpływie na wiriony. Do najważniejszych z nich należą: temperatura, wilgotność, nasłonecznienie oraz środowisko, w jakim HIV znalazł się poza organizmem (np. jego pH, obecność środków odkażających, substancji hamujących krzepnięcie). Dodatkowo bardzo istotny wpływ odgrywa rodzaj i ilość zakaźnego materiału biologicznego, a zwłaszcza liczba w nim kopii HIV-RNA. Istotnym ograniczeniem większości, również cytowanych w niniejszym opracowaniu badań, często uniemożliwiającym przełożenie uzyskanych wyników na codzienną praktykę kliniczną jest poddawanie doświadczeniom materiału biologicznego otrzymanego sztucznymi metodami np. przez dodanie do krwi pochodzącej od osoby niezakażonej wirusa z hodowli komórkowej. Uzyskana w ten sposób liczba kopii HIV-RNA w porównaniu do wartości obserwowanych u osób zakażonych jest zawyżona. Stąd też brak potwierdzenia w badaniu wpływu danego czynnika może prowadzić do wyciągnięcia fałszywych wniosków. Ponadto wciąż brakuje metod pozwalających na obiektywne badanie zakaźności HIV – przeważnie

wykorzystuje się linie komórkowe, w których określa się liczbę powstających syncytiów po dodaniu wirusa, ale również w części z nich zakaźność HIV była wyrażana aktywnością odwrotnej transkryptazy [5,9,11,19,20].

Istotnym problemem jest również złożona biologia HIV. Właściwości zakaźne wykazują zarówno wiriony – wolne cząstki poza komórkami gospodarza, ale również komórki zakażone HIV – zdolne do przenoszenia wirusa przez tworzenie z komórkami niezakażonymi syncytiów. Czynniki zewnętrzne działają odmiennie na obie postaci wirusa i często utrata zakaźności lub inaktywacja jednej z nich wcale nie jest równoznaczna z całkowitą dezaktywacją drugiej postaci wirusa i tym samym pozbawieniem zakaźności badanego materiału biologicznego. W dotychczas przeprowadzonych badaniach naukowych często skupiano uwagę jedynie na wrażliwości jednej z powyższych postaci pomijając drugą równie istotną [7,12,13,16].

WPLYW WYSOKIEJ TEMPERATURY NA ZAKAŻNOŚĆ HIV

Obecnie najlepiej poznano wpływ wysokiej temperatury na zakaźność, dezaktywację oraz liczbę kopii HIV-RNA. Przy optymalnej wartości pH wynoszącej 7,1 biologiczny okres przetrwania HIV w temperaturze 37°C wynosi około 24 godziny [19]. Ogrzewanie surowic osób zakażonych HIV w 56°C przez 10 minut znacznie zmniejszało ich zakaźność, przy jednoczesnym braku wpływu na liczbę przeciwciał anti-HIV i wynik badania EIA. Ich zakaźność zmniejszyła się z 10^{3.5} TCID₅₀ do 10¹ TCID₅₀. Spośród 135 surowic poddanych takiej temperaturze jedynie jedna nadal pozostała zakaźna [15]. Także ogrzewanie stabilizowanego cytrynianem trójsodu, L-lizyną, glukonianem wapnia i sorbitolem osocza w temperaturze 50°C przez jedną godzinę powodowało pozbawienie HIV właściwości zakaźnych – liczba cząstek wirusa wolnego zmniejszyła się o ponad 6,6 log wartości wyjściowej [10]. Potwierdzają to również badania Wanga i wsp., w których poddano surowice temperaturze 56°C przez minimum 30 min lub 65°C przez 15 min. Po jej dodaniu do kultur komórkowych wirus nie wykazywał właściwości zakaźnych – tworzenie syncytiów zostało zahamowane. Jednocześnie w powyższych warunkach poziom HIV-RNA i przeciwciał anti-HIV-1 nie uległ zmianie [22].

Ważną drogą przenoszenia zakażenia HIV na kolejne komórki jest tworzenie przez zakażone limfocyty T CD4 syncytiów z innymi komórkami. Na szybkość tego procesu również ma wpływ temperatura – zostaje on zahamowany poniżej 25°C. Wynika to przede wszystkim ze zmian

w cytoszkielecie komórek oraz częściowo ze zmniejszonej zdolności gp-120-gp41 do łączenia się z komórkami T CD4⁺ (obniżona w temperaturze poniżej 25°C, powyżej tej temperatury wzrasta 3–4 razy). Wyników tych jednak nie można przenieść na kinetykę łączenia się wolnego wirusa z komórkami. Zależy ona w przeważającej mierze od interakcji między poszczególnymi koreceptorami, a nie od zmian na poziomie cytoszkieletu komórki [7].

WPLYW NISKIEJ TEMPERATURY NA ZAKAŻNOŚĆ HIV

Wpływ niskiej temperatury na zakaźność HIV, zdolność do jego inaktywacji i liczbę kopii HIV-RNA został zdecydowanie słabiej zbadany. Temperatura –75°C nie wpływa w istotny sposób na liczbę cząstek HIV w materiale biologicznym przechowywanym powyżej 6 miesięcy [5,19]. Pozostawienie krwi w temperaturze 4°C przez 72 godziny nie zmniejsza znacząco liczby kopii HIV-RNA, jednak po tym okresie rozpoczyna się rozkład HIV (po 168 godzinach przechowywania liczba kopii HIV-RNA zmniejszyła się średnio o 0,336 log wartości wyjściowej HIV-RNA) [8].

Jak wcześniej wspomniano tworzenie syncytiów komórek zakażonych HIV i wrażliwych na zakażenie zależy od temperatury – najszybciej proces ten zachodzi w temperaturze 37°C, natomiast poniżej 0°C zostaje całkowicie zahamowany [13]. Ponadto pięć- i siedmiokrotne powtórzenie cykli złożonych z mrożenia do –70°C i rozmrażania do 37°C materiału zakaźnego zawierającego wirusy wolne zmniejsza liczbę tworzonych syncytiów. Sugeruje to, że HIV zmienia się z postaci zdolnej do tworzenia syncytiów (zakaźnej) do niemającej takiej zdolności (niezakaźnej). Kilkakrotne gwałtowne zmiany temperatury nie wpływają przy tym w istotny sposób na miano przeciwciał anti-HIV [22]. Pojedyncze zamrożenie do temperatury –70°C i rozmrożenie próbki nie miało statystycznie istotnego wpływu na liczbę kopii HIV-RNA w surowicy pobranej na EDTA, heparynę i ACD, jednak we wszystkich próbkach zaobserwowano zmniejszenie poziomu HIV RNA [9]. Natomiast już pięciokrotne zamrożenie i rozmrożenie działało destruktywnie na HIV RNA – jego wartość zmniejszyła się średnio o 0,623 log wartości wyjściowej [8].

Istnieją jednak badania, w których oprócz niskiej temperatury próbki były poddawane dodatkowo innym czynnikom. W wysuszonej próbce krwi zawierającej HIV liczba kopii HIV-RNA zmniejsza się znacznie w ciągu kilku godzin [18]. Wsuszenie zakaźnej surowicy na szkle oraz zamrożenie powodowało zmniejszenie odpowiednio 5–12 razy i 4–5 razy jego zakaźności [19]. W temperaturze –10°C i pod ciśnieniem 100 MPa zakaźność HIV zmniejszyła się do około 1/100, natomiast była całkowicie tracona w temperaturze –20°C i pod ciśnieniem 200 MPa. W warunkach tych dochodziło do zmniejszenia aktywności odwrotnej transkryptazy HIV do 1/10 wartości wyjściowej oraz utraty zdolności HIV do łączenia się z komórkami T CD4⁺. Inaktywację limfocytów T i makrofagów wykazujących tropizm do HIV stwierdzano w temperaturze –30°C i pod ciśnieniem 250 MPa. Tylko wysokie ciśnienie (ponad 400

MPa) również działało destruktywnie na HIV w temperaturze pokojowej – w ciągu 10 min był on całkowicie inaktywowany. Jednak połączenie dwóch czynników – wysokiego ciśnienia i niskiej temperatury pozwalało na zastosowanie każdego z tych czynników w mniejszym natężeniu. Jest to o tyle wartościowe, że do wytworzenia wysokiego ciśnienia w temperaturze poniżej 0°C nie jest wymagana żadna specjalistyczna aparatura – wysokie ciśnienie jest w naturalny sposób generowane w trakcie zamrażania dokładnie zamkniętej próbki (FPGM) [16].

Samo mrożenie w niewielkim stopniu wpływa na liczbę zakażonych HIV leukocytów. Jednak połączenie niskiej temperatury z przesączaniem na filtrach celulozowych i poliestrowych może zmniejszyć liczbę zakażonych komórek minimum 2,5 log wartości wyjściowej [6].

WPLYW OBJĘTOŚCI KRWI NA ZAKAŻNOŚĆ HIV

Obecność HIV zdolnego do zakażenia zależy od objętości krwi, która pozostała w igle – większa wydłuża czas przeżycia wirusa¹, przy czym wolny wirus jest dłużej zdolny do przeżycia niż wirus występujący w komórkach. Igły z 2 µl zakażonej krwi przechowywane w temperaturze pokojowej – pozostawały zakaźne przez 21 dni, natomiast w przypadku 20 µl – przez 42 dni (w obu przypadkach było to 8% strzykawkę). W wyższych temperaturach (27, 32 i 37°C) po jednym tygodniu przechowywania obu rodzaju strzykawkę ich liczba z wirusem zdolnym do zakażenia zmniejszyła się do mniej niż 1%. Po 42 dniach przechowywania w 4°C igieł zawierających 2 µl i 20 µl zakażonej krwi 50% z nich zawierała wirulentnego HIV [2,3,18].

WPLYW ŚRODKÓW DEZYNFEKCYJNYCH NA ZAKAŻNOŚĆ HIV

Nie stwierdzono wpływu temperatury na aktywność środków dezynfekcyjnych – ich aktywność była zbliżona zarówno w temperaturze pokojowej, jak i podwyższonej. Najskuteczniejszym środkiem do eliminacji HIV ze wspólnych igieł i strzykawkę były wybielacze. Zachowują one swoją aktywność aż do rozcieńczenia z wodą w stosunku 1:10. Działanie ich nie zależy od użytej objętości, jednak kolejne przemycie wybielaczem sprzętu znacznie zwiększa skuteczność [1].

WPLYW MEDIUM NA ZAKAŻNOŚĆ HIV

Także środowisko w jakim znalazł się wirus poza organizmem człowieka w istotny sposób wpływa na czas jego zdolności do zakażenia – stwierdzono znaczne różnice w zdolności do zachowania zakaźności w środowisku sztucznych kultur komórkowych i bezpośrednio w surowicy pacjentów zakażonych HIV. Stwierdzono, że czas zachowania wirulentności HIV w drugim przypadku w temperaturze pokojowej wynosił 3 godziny od pobrania materiału. Natomiast dodanie surowicy osoby zakażonej do osocza osoby niezakażonej powodowało, że liczba wirusa nie ulegała istotnym zmianom przez ponad 24 godziny [17]. W innych badaniach stwierdzono utrzymywanie się zakaźności

¹ Pość krwi pozostającej w sprzeczce do iniekcji bezpośrednio zależy od metody podawania narkotyku – w Europie, gdzie igły są łatwo dostępne, a narkomani do iniekcji używają 2 ml strzykawkę, zostaje w nich 30 µl, natomiast w USA, gdzie najczęściej używa się strzykawkę 1 ml z igłami 5/8 cala, a tłok strzykawkę po podaniu narkotyku jest całkowicie przyścięty, pozostaje mniej niż 2 µl.

pełnej krwi przechowywanej w temperaturze pokojowej przez 5–14 dni [21]. Przyczynę tego należy najprawdopodobniej upatrywać w zdolności surowicy osób zakażonych do szybszej inaktywacji HIV poprzez endogenne immunoglobuliny klasy G [17].

HIV jest bardziej stabilny w pełnej krwi w porównaniu z innymi mediami czy z krwią z dodatkami – w pełnej krwi wirus ma kontakt z naturalnym środowiskiem, m.in. komórkami, w których może bytować, natomiast w medium jest narażony na szkodliwe działanie substancji chemicznych [21]. Przechowywanie pełnej krwi w temperaturze 4°C powodowało dwukrotne zmniejszenie liczby kopii HIV-RNA po 8 godzinach od jej pobrania [11]. Natomiast w tej samej temperaturze wyraźny spadek HIV-RNA już po 6 godzinach od pobrania zauważono w pełnej krwi z dodatkiem EDTA lub heparyny (stały spadek w ciągu pierwszych 24 godzin). Przechowywanie w temperaturze pokojowej przez 18 godzin pełnej krwi pobranej na ACD może zmniejszać aż do ponad 1 log wartości wyjściowej HIV-1 RNA [9].

Materiał genetyczny wirusa w temperaturze 4°C był stabilny przez 14 dni jedynie w surowicy bez dodatków i z EDTA [5]. W osoczu oraz pełnej krwi pobranej na EDTA poziom HIV-1 RNA nie zmienił się statystycznie istotnie podczas przechowywania próbek przez 30 godzin zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w 4°C [9]. Podwyższenie temperatury do 30°C spowodowało znaczny jego spadek już w ciągu pierwszych 2 dni. Degradacja materiału genetycznego wirusa zachodziła również w pełnej krwi pobranej na heparynę przechowywanej w temperaturze 25°C, ale poziom HIV-RNA w pełnej krwi z EDTA w tych samych warunkach był stabilny [5].

Przechowywanie w –70°C surowicy i osocza pobranego na EDTA, ACD i heparynę przez 6 miesięcy skutkowało znacznym spadkiem poziomu HIV RNA. Największy spadek (o ponad 0,3 log) stwierdzono w osoczu pobranym na heparynę. Natomiast w podłożu zawierającym osocze z EDTA i ACD oraz surowicę wynosił odpowiednio 0,242, 0,271 i 0,317 log wartości wyjściowej. Zmiany te najprawdopodobniej wynikają z wiązania wolnych cząstek wirusa przez płytki krwi [9].

Jak wcześniej wspomniano czas przeżycia wirusa wolnego i występującego w komórkach może się różnić. Stwierdzono zmniejszenie miana HIV w kulturach komórkowych zawieszonych w temperaturze pokojowej w 10% surowicy o prawie 8 log TCID₅₀ dla wirusa wolnego i o ponad 6 log TCID₅₀ dla wirusa w komórkach między 4 a 5 tygodniem (zmniejszenie zakaźności o 1 log TCID₅₀ odpowiednio po 122 i 146 godzinach). Czas ten ulegał wydłużeniu w podłożu zawierającym nierozcieńczoną surowicę i wynosił dla wirusa wolnego 308 godzin. Wyniki te sugerują, że białka zawarte w surowicy chronią wirusa przed inaktywacją [20].

Rodzaj podłoża może również wpływać na czas przeżycia wirusa w temperaturze pokojowej po jego wysuszeniu – utrata zakaźności wirusa komórkowego zawieszonyego pierwotnie w 10% surowicy o ponad 6 log TCID₅₀ wynosiła około 6 dni (utrata zakaźności o 1 log TCID₅₀ – poniżej 1 dnia), natomiast zakaźności dla wirusa wolnego po 1 tygodniu była jedynie nieznacznie zmniejszona (utrata zakaźności o 1 log TCID₅₀ – ponad 70 godzin). Na uzyskane wyniki

może wpływać naturalne skrócenie czasu życia komórek zakażonych HIV w porównaniu do niezakażonych [20].

WPLYW LICZBY KOPII HIV-RNA NA ZAKAŻNOŚĆ HIV

Przedstawione wyżej wyniki odnoszą się jedynie do surowicy krwi i nie uwzględniają wyjściowej wartości liczby kopii HIV-RNA – od jej poziomu zależy szybkość zmniejszania się zakaźności materiału biologicznego, np. przy pierwotnej wartości 5,5 log TCID₅₀ wirusa związanego z komórkami nie stwierdzano po 6 dniach, natomiast przy 1,5 log TCID₅₀ już po mniej niż 3 dniach (najkrótszy mierzony przedział czasu w opisywanym doświadczeniu). Wartości te dla wirusa wolnego wynosiły odpowiednio – powyżej 7 dni i 4 dni [20].

Istotne, z punktu widzenia ryzyka zakażenia HIV jest również spostrzeżenie, że stężenie HIV-1 RNA w surowicy jest mniejsze w porównaniu do pełnej krwi [5] oraz osocza (0,094–0,839 log wartości wyjściowej) [9]. Wynikać to może z zatrzymywania cząsteczek wirusa w tworzącym się skrzepie, destruktywnego działania proteaz i nukleaz uwalnianych z płytek krwi podczas ich rozpadu oraz przez aktywowane w niższej temperaturze granulocyty [5].

WPLYW MUTACJI W MATERIALE GENETYCZNYM HIV NA JEGO ZAKAŻNOŚĆ

Rozpatrując zagadnienie wrażliwości HIV na działanie czynników zewnętrznych należy pamiętać, że mutacje w materiale genetycznym wirusa mogą w istotny sposób modyfikować jego wrażliwość. Poszczególne mutanty HIV różniące się sekwencją nukleotydów w genie *Nef* wykazują różną wrażliwość na temperaturę i zależną od niej aktywność zakaźną [4,14]. W przypadku szczepów HIV zawierających w pozycji 66 histydyne, niska temperatura powoduje inaktywację gp120 i gp41 – białek niezbędnych do wnिकnięcia wirusa do komórki. Natomiast wystąpienie mutacji w powyższej pozycji powoduje, że oba białka błonowe nie tracą w niższej temperaturze zdolności do łączenia się z receptorem CD4 i CCR5 lub CXCR4 [12].

Mimo upływu czasu nadal nie zostały jednoznacznie określone graniczne wartości temperatury, wilgotności, nasłonecznienia, pH środowiska czy stężenia i rodzaju substancji hamujących krzepnięcie, w których HIV traci zakaźność. Rozpatrując to zagadnienie należy brać pod uwagę wszystkie powyższe czynniki, a podawanie tylko jednego z nich może prowadzić do błędnych wniosków. Ponadto badanie tylko wpływu czynników na zakaźność HIV, z punktu widzenia metodologicznego, jest trudne. Do jej utraty nie jest konieczne znaczące zmniejszenie ilości materiału genetycznego wirusa – ważną rolę odgrywają również mutacje, zmiany w strukturze receptorów. Badania takie, z powodu złożonej biologii wirusa, powinny również określać graniczne wartości dla wirusa wolnego i występującego w zakażonych komórkach. Poznanie powyższych czynników ma ogromne znaczenie praktyczne – dzięki wyeliminowaniu zakaźności HIV praca z materiałem zakaźnym staje się bezpieczniejsza, zwłaszcza że do dezaktywacji przeciwciał anti-HIV jest wymagana większa temperatura niż do utraty zakaźności HIV. Dzięki temu, po zadziałaniu odpowiednich czynników przez wystarczająco długi czas, można w bezpieczny sposób wykonywać badania ELISA czy western blotting.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdala N., Crowe M., Tolstov Y., Heimer R.: Survival of human immunodeficiency virus type 1 after rinsing injection syringes with different cleaning solutions. *Subst. Use Misuse*, 2004; 39: 581–600
- [2] Abdala N., Reyes R., Carney J.M., Heimer R.: Survival of HIV-1 in syringes: effects of temperature during storage. *Subst. Use Misuse*, 2000; 35: 1369–1386
- [3] Abdala N., Stephens P.C., Griffith B.P., Heimer R.: Survival of HIV-1 in syringes. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 1999; 20: 73–80
- [4] Aiken C., Krause L., Chen Y.L., Trono D.: Mutation analysis of HIV-1 Nef: identification of two mutants that are temperature-sensitive for CD4 downregulation. *Virology*, 1996; 217: 293–300
- [5] Bruisten S.M., Oudshoorn P., van Swieten P., Boeser-Nunnink B., van Aarle P., Tonreau S.P., Cuypers H.T.: Stability of HIV 1 RNA in blood during specimen handling and storage prior to amplification by NASBA QT. *J. Virol. Methods*, 1997; 67: 199–207
- [6] Bruisten S.M., Tersmette M., Wester M.R., Vos A.H., Koppelman M.H., Huisman J.G.: Efficiency of white cell filtration and freeze-thaw procedure for removal of HIV-infected cells from blood. *Transfusion*, 1990; 30: 833–837
- [7] Frey S., Marsh M., Gunther S., Pelchen-Matthews A., Stephens P., Ortlepp S., Stegmann T.: Temperature dependence of cell-cell fusion induced of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 1995; 69: 1462–1472
- [8] Gessoni G., Barin P., Valverde S., Giacomini A., Di Natale C., Orlandini E., Arregghini N., De Fusco G., Frigato A., Fezzi M., Antico F., Marchiori G.: Biological qualification of blood units. Considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transfus. Apheresis Sci.*, 2004; 30: 197–203
- [9] Ginocchio C.C., Wang X.P., Kaplan M.H., Mulligan G., Witt D., Romano J.W., Cronin M., Carroll R.: Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35: 2886–2893
- [10] Goubran H.A., Burnouf T., Radosevich M.: Virucidal heat-treatment of single plasma units: a potential approach for developing countries. *Haemophilia*, 2000; 6: 597–604
- [11] Holodniy M., Mole L., Yen-Lieberman B., Margolis D., Starkey C., Carroll R., Spahlinger T., Todd J., Jackson J.B.: Comparative stability of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in vacutainer CPT, vacutainer PPT, and standard vacutainer tubes. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 1562–1566
- [12] Kassa A., Finzi A., Pancera M., Courter J.R., Smith A.B.3rd, Sodroski J.: Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein variant resistant to cold inactivation. *J. Virol.*, 2009; 83: 447–4488
- [13] Kinchington D., Barker W., Galpin S., Apostolov K.: Temperature enhancement of syncytium formation by HIV and Sendai virus. *J. Med. Virol.*, 1992; 36: 44–48
- [14] Manchester M., Everitt L., Loeb D.D., Hutchinson C.A.3rd, Swanstrom R.: Identification of temperature-sensitive mutants of the human immunodeficiency virus type 1 protease through saturation, mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 7689–7695
- [15] Markowski M.A., Coard J.G., Griffith B., Mayo D.R.: Effect of 10 minutes heat treatment on HIV antibody testing from alternate testing sites. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1988; 9: 225–230
- [16] Otake T., Kawahata T., Mori H., Kojima Y., Hayakawa K.: Novel method of inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the freeze pressure generation method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005; 67: 746–751
- [17] Pan L.Z., Werner A., Levy J.A.: Detection of plasma viremia in human immunodeficiency virus-infected individuals at all clinical stages. *J. Clin. Microbiol.*, 1993; 31: 283–288
- [18] Thompson S.C., Boughton C.R., Dore G.J.: Blood-borne viruses and their survival in the environment: is public concern about community needlestick exposures justified? *Aust. N. Z. J. Public Health*, 2003; 27: 602–607
- [19] Tjotta E., Hungnes O., Grinde B.: Survival of HIV-1 activity after disinfection, temperature and pH changes, or drying. *J. Med. Virol.*, 1991; 35: 223–227
- [20] Van Dueren J., Simpson R.A., Jacobs P., Cookson B.D.: Survival of human immunodeficiency virus in suspension and dried onto surfaces. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32: 571–574
- [21] Vandamme A.M., Van Laethem K., Schmit J.C., Van Wijngaerden E., Reynders M., Debyser Z., Witvrouw M., Van Ranst M., De Clercq E., Desmyter J.: Long-term stability of human immunodeficiency virus viral load and infectivity in whole blood. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1999; 29: 445–452
- [22] Wang G.R., Yang J.Y., Lin T.L., Chen H.Y., Horng C.B.: Temperature effect on the sensitivity of ELISA, PA and WB to detect anti-HIV-1 antibody and infectivity of HIV-1. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, 1997; 59: 325–333

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.