Resistência do vírus da gripe à ação oligodinâmica da prata

por

J. Guilherme Lacorte, Estacio Monteiro e J. Carvalho Loures

A ação oligodinâmica de vários metais e especialmente da prata tem sido estudada em relação aos sêres vivos de um modo geral, em particular sôbre protozoários e bactérias. Dêsses estudos decorreu a aplicação prática, feita de diversas maneiras e muito divulgada, do emprêgo dessa propriedade na esterilização da água. Experimentalmente, no que diz respeito aos vírus, o terreno ainda não foi explorado, razão por que iniciamos as nossas pesquisas nesse sentido dando, com a presente nota, os resultados das nossas primeiras observações.

MATERIAL E MÉTODOS

Nas experiências aqui relatadas empregamos o vírus da gripe tipo A, amostra PR8, existente em nosso laboratório desde 1944, proveniente do Instituto Rockefeller de Nova York e desde aquela data mantido pelas passagens em embriões de galinha e camundongos brancos, menos em hamsters e furões. Outra amostra empregada foi a que denominamos DL Rio, pertencente ao tipo A-primo, por nós isolada no decorrer do surto epidêmico que ocorreu no Rio de Janeiro em 1950/51 e desde aquela ocasião mantida do mesmo modo que a anterior. Essas amostras de vírus foram empregadas no líquido alantóide de embriões de 13 dias, inoculadas 48 horas antes, diretamente na cavidade alantóide. As amostras bacterianas usadas nas provas concomitantes foram a Escherichia coli e o Micrococcus pyogenes isoladas em nosso meio, ambas do homem, a primeira das fezes e a segunda de caso de furunculose. Têm sido mantidas em gelose simples. No que diz respeito à natureza da prata destinada a provocar o efeito oligodinâmico empregamos a que se encontra em recipientes especiais de barro, encontrados no comércio sob o nome de moringas esterilizantes. Nelas a prata se distribui, ora recobrindo a sua superfície interna ora, sob a forma de pó, misturada ao próprio barro. No primeiro caso, adere a êste, também sob as mesmas condições. Ésses recipientes são largamente disseminados em nosso meio destinado ao fim acima referido. Prestaram-se, de modo excelente, ao que pretendíamos sendo sòmente necessário, algumas vêzes, devido ao tempo prolongado das experiências, recobri-los com verniz, para evitar ou diminuir a evaporação. O vírus destinado a servir de testemunha

foi sempre retirado do mesmo lote de líquido alantóide e colocado em idênticos recipientes de barro, sem prata, uma vez em balão de vidro. A verificação prévia do poder esterilizante dessas moringas foi feito nelas se colocando a suspensão bacteriana em água estéril ou líquido alantóide. Os animais usados foram os camundongos brancos, da criação do Instituto Oswaldo Cruz, com a idade de 3 a 4 semanas. Empregaram-se 10 animais para cada diferente diluição do vírus ou cada prova. A inoculação foi feita por via nasal, na dose de 0,05 ml após anestesia do animal pelo éter. Anotaram-se os animais que morreram até o décimo dia e apresentaram, pelo exame necroscópico, lesões pulmonares características. As provas *in vitro* foram feitas pela reação de hemaglutinação, conforme a técnica de Hirst, empregando-se, para a sua execução, hemácias lavadas de galinha e diluições do líquido alantoide contendo vírus. No decorrer das experiências, o material contendo vírus foi sempre mantido na geladeira à temperatura de 3-5°C.

RESULTADOS

Experiência n.º 1, de 9 de novembro de 1954.

Experiência n.º 2, de 11 de novembro de 1954.

Foram colocadas em moringa contendo prata e em moringa sem prata, suspensões de *Escherichia coli* em água destilada.

Número de bactérias por ml, antes de colocar no recipiente . 48.000 circa. (Mesmo processo de verificação que para o caso anterior)

Experiência n.º 3, de 25 de setembro de 1955.

As experiências acima vieram comprovar a ação oligodinâmica da prata sôbre as bactérias empregadas, mesmo quando em suspensão no líquido alantóide.

Experiência n.º 4, de 24 a 30 de agosto de 1954.

Foram colocadas em moringa contendo prata e em moringa simples, sem prata, duas partes iguais do mesmo líquido alantóide contendo vírus da gripe, amostra PR8, iniciando-se a verificação do seu poder patogênico para camundongos desde 30 minutos depois até 6 dias, conforme se poderá ver pelo quadro n.º 1, onde se registraram os animais mortos, podendo-se verificar que o vírus não se alterou, isto é, não sofreu a ação oligodinâmica da prata.

QUADRO 1

SÉRIE DAS	B14	Diluia	TEMP				•		DIA	lS	_					
INOCULAÇÕES	Número das	Diluição do	PERMANE RECIPI		1	2	3	4	5	6	7	8 , 9				
VIRUS E DATA	mocuiações:	virus	Com prata	Sem prata		Número de camundongos mortos										
1 PR8 24-8-1954	5679 5680 5681	1/10 1/100 1/1000	30 minutos 30 minutos 30 minutos				2 1 —	 	? 	3	1 1	3 1 1	3			
PR8 24-8-1954	5670 5671 5672	1/10 1/100 1/1000		30 m nutos 30 minutos 30 minutos				 	— — — — — — — — — — — — — — — — — — — — — — —	4 1 1	2	1	; — 1	5 		
3 PR8 24-8 1954	5682 5683 5684	1,100 1,100 1/1000	60 minutos 60 minutos 60 minutos	——————————————————————————————————————	——————————————————————————————————————			 		2	; 1 -	1 1		2		
PRS 24-8-1954	5673 5674 5675	1/10 1/100 1/1000		60 minutos 60 minutos 60 minutos			— — — — — — — — — — — — — — — — — — —			2 1 1				 		
5 PR8 24-8-1954	5685 5686 5687	1/10 1/100 1/1000	2 horas 2 horas 2 horas					 		 1 -	; —		1 — —	1 		
6 PR8 24-8-1954	5676 5677 5678	1/10 1/100 1/1000		2 horas 2 horas 2 horas					 - ·	4 4 3	1 5 2	1 1	 	• · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
7 PR8 26 8-1954	5704 5688 5689	1 10 1 100 1/1000	2 dias 2 dias 2 dias		1		\ -	1	1 1 4	1 2 2	/ - -	2 3	1 2	l		
8 PR8 26 8 1954	5690 5691 5692	1 10 1 100 1 1000		2 dias 2 dias 2 dias		 		4	3 3 3	1 2	2	1 2	 !			
9 PR8 27 8 1954	5696 5697 5698	1/10 1/100 1/1000	3 dias 3 dias 3 dias		- -	\ \ \ -		- ! -	3 1 3	1 2 2	1 1	2	· _ · · _ · · · · · · · · · · · · · · ·			
10 PR8 27 8 1954	5693 5694 5695	1/10 1/100 1/1000	-	3 dias 3 dias 3 dias				1 2 1	1 1 3	2	: - 2 1	;	1			
11 PR8 30/8/1954	5706 5707 5708	1/10 1/100 1/1000	6 dias 6 dias 6 dias			 	· ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! ! !	: !	4 	3 1	; 2	1 1 4	 			
12 PR8 30/8/1954	5709 5710 5711	- 1 40 1/100 1, 1000	-	6 dias 6 dias 6 dias				1	1 2	1 2	2	- - -	1	1		

Quadro demonstrativo do poder patogênico, para camundongos brancos, do vírus da gripe (amostra PR8), depois de submetido à ação oligodinâmica da prata, em comparação com os animais testemunhas. Experiência n.º 4.

Experiência n.º 5, de 12 a 19 de novembro de 1954.

Feita nas mesmas condições da anterior, porém com o tempo decorrido de 3 e 7 dias em séries repetidas e, como na experiência n.º 4, feitas as verificações em diluições do líquido alantóide desde 1:10 até 1:1000. Esta experiência confirmou o que se observara: o vírus manteve o seu poder patogênico para os camundongos depois de 7 dias de permanência no recipiente contendo prata, conforme se poderá ver no quadro n.º 2.

QUADRO 2

SÉRIE DAS INOCULAÇÕES VIRUS E DATA	Número	Diluição	TEMP						DIA	\S				
	das	do		ENTE:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
*			Com prata	Sem prata			Núi	úmero de camundongos mortos						
1 PR8 12-11-1954	5837 5838 5839	1 10 1 100 1 1000	3 dias 3 dias 3 dias		-	-	2	2 3	3 2 4	1 3 3	1 2	· ·	 - -	2
2 PR8 12-11-1954	5840 5841 5842	1 10 1 100 1 1000		3 dias 3 dias 3 dias	1	-	2 2	3 2	3 2 1	1 1 2		!	- - -	2 4
3 PR8 12-11 1954	5846 5847 5848	1 10 1 100 1 1000	3 dias 3 dias 3 dias	; <u></u> ;	2	_	1 ;	2 2 1	3 ; 3 4	1		 - 		-
4 PRS 12-11-1954	5843 5844 5845	1/10 1/100 1/1006		3 ias 3 dias 3 dias	1	- -	2	1 1 2	5 2 4	1	 - -	 :	: - -	1
5 PR8 12-11-1954	5849 5850 5851	1 10 1 100 1 1(00	3 dias 3 dias 3 dias		- · - ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · ·	4	2	2	 1	1			
6 PRS 16- 1-1954	5852 	1 10 - -	 -	7 dias	1 	- -	2	2	2 1		2 2 	1	· - . - -	
7 PR8 19–11–1954	5853 5854 5855	1 10 1 100 1 1000	7 dias 7 dias 7 dias	·	- - -	1 1	- 	1	4 - 6 + 3 +	2 1 1	1 - 1	1		
PRS 19-11 1954	5856 5857 5858	1 10 1 100 1 100		7 dias 7 dias 7 dias		1 	 	 2 2	1 2 1	2 2 2	2 1 2	3 1 1	-· 1	1 1
9 PR8 19-11-1954	5859 5860 5861	1 10 1 100 1 1000	7 dias 7 dias 7 dias		1 1		 	1	1 2 4	1 2 2	1 1 1	2	-	2
10 PR8 19- 1-1954	5862 5863 5864	I/10 I,100 1,100	<u>-</u>	7 dias 7 dias 7 dias	 	-	 	 3 -	1 1 4	1 2 1	2 3 1			1 -1
11 PR8 19-11-1954	5865 5866 5867	1/10 1/1000 1/1000	7 dias 7 dias 7 dias			2		- - 1	1 2 6	1 4	1 2	1 1	1	1
12 PR8 19-11-1954	5868 5869 5870	1/10 1/100 1/1000	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	7 dias 7 dias 7 dias	1				1 2 1	3 4 1	2 1	1 —	2	1

Quadro demonstrativo do poder patogênico, para camundongos brancos, do vírus da gripe (amostra PR8), depois de submetido à ação oligodinâmica da prata, em comparação com os animais testemunhas. Experiência n.º 5.

Experiência n.º 6, de 30 de agosto a 5 de setembro de 1955.

Foram colocadas em moringa contendo prata e em moringa simples, sem prata e em balão de vidro, partes iguais do mesmo líquido alantóide contendo vírus da gripe, amostra DL/Rio e mais o *Micrococcus pyogenes* na proporção de 220.000 por ml.

O tempo de permanência foi de 5 e 10 dias verificando-se do mesmo modo o nenhum efeito experimentado pelo vírus conforme se poderá

ver no quadro n.º 3.

QUADRO 3

CÉDIT DAG	Midmonn	Midmonn	Múmana	81 /4	Mámana	81 4	81 %		Diluição	TEMP DEDMANŜI	DE NO					DI	AS				
SÉRIE DAS INOCULAÇÕES VIRUS E DATA	Número das inoculações:	Diluição do virus	PERMAVÊNCIA NO RECIPIENTE:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
			Com prata	Sem prata			Núm	ero de	eamu	ndonga	s mor	tos —	ī								
1 DL 30-8-1955	6027 6028 6029	1/10 1;100 1/1000	-	5 dias 5 dias 5 dias	1		 1	1 — —	— — —					1 —							
DL 30-8-1955	6023 6024 6025	1 10 1 100 1 1000		5 di s 5 di s 5 di s	1 					1	——————————————————————————————————————		——————————————————————————————————————	1							
3 DL 30 8-1955 *	6020 6021 6022	1/10 1/100 1/1000	5 dias 5 dias 5 dias		1			— — —			——————————————————————————————————————	— — —		1 —							
4 DL 30-8-1955	6017 6018 6019	1 10 1 100 1 1000	- \	5 di s 5 dias 5 dias	1					1	1	1 —	1 -								
5 DL 30-8-1955 ***	6014 6015 6016	1 10 1/100 1/1000	5 di s 5 dias 5 dias				1 -		——————————————————————————————————————				1	2							
6 DL 5-9 1955	6042 6043 6044	Puro 1/10 1/100		10 dies 10 dies 10 dies	1			——————————————————————————————————————	1 2	2		1		3 -							
7 DL 5-9-1955	6039 6041 6040	Puro 1,10 1,100		10 dias 10 dias 10 dias	1 1 		1		1	 	——————————————————————————————————————			2							
8 DL 5- 9-1955	6038 6036 6037	Puro 1/10 1/100	10 dias 10 dias 10 dias		- 1	— — —				1 1		1 -	1 -	1							
9 DL 5 9-1955 ***	6033 6034 6035	Puro 1·10 1/100		5 dias 5 dias 5 dias	1 —				1 —	——————————————————————————————————————	1 1 1	 1 —	——————————————————————————————————————	1 -							
10 DL 5 9 1955	6032 6030 6031	Puro 1/10 1/100	5 dias 5 dias 5 dias		- \		 1 		1		1	2		6 3							

Quadro demonstrativo do poder patogênico, para camundongos brancos, do vírus da gripe (amostra DL/Rio), depois de submetido à ação oligodinâmica da prata, em comparação com os animais testemunhas. Experiência n.º 6.

* Só vírus.

** Recipiente de vidro. Só virus.

^{***} Liquido contendo virus e Micrococcus pyogenes.

Cumpre ressaltar, nesta prova, que o *Micrococcus pyogenes* junto ao líquido alantóide em nada alterou a atividade do vírus, quer na dosagem prévia quando ainda proliferou no meio de cultura na proporção acima indicada, quer depois de morto pela ação oligodinâmica. O vírus não se alterou quanto ao seu poder patogênico nem quanto à sua propriedade hemaglutinante, conforme a experiência n.º 9.

Experiência n.º 7, de 28 a 30 agosto de 1954.

Foram feitas reações de hemaglutinação com o líquido alantóide contendo vírus da gripe, amostra PR8, depois de ter permanecido de 30 minutos até 10 dias na moringa contendo prata e na moringa simples, sem prata. Os resultados mostraram-se praticamente idênticos para ambos os casos. A ação oligodinâmica não altera o poder hemaglutinante do vírus.

TITULO HEMAGLUTINANTE TEMPO DE PERMANÊNCIA SÉRIE E DATA NO RECIPIENTE: 1 128 | 1 256 1,512 1,1024 1/32 1 64 1/16 1/4 18 Com prata Sem prata 1/2 hora 24-8-54 1'2 hora 1 hora 1 hora 2 horas 2 horas 2 dias 26-8-54 2 dias 3 dias 3 27-8-54 3 dias 6 dias 30-8-54 6 dias 10 dias 3 - 9 - 5410 dias

QUADRO 4

Quadro demonstrativo das reações de hemaglutinação com o vírus da gripe (amostra PR8), depois de submetido à ação oligodinâmica da prata, em comparação com as testemunhas. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem a +, ++, +++ e +++++. Experiência n.º 7.

Experiência n.º 8, de 22 de setembro a 6 de outubro de 1954.

Feita nas mesmas condições da anterior, porém com o tempo decorrido de 11 a 25 dias. Apesar do tempo de permanência ter sido bastante prolongado os resultados foram os mesmos do caso anterior.

QUADRO 5

SÉRIE E DATA	TEMPO DE PERMANÊNCIA		TÍTULO HEMAGLUTINANTE											
		PIENTE: Sem prata	1 4	18	1 16	1 32	1 64	1 128	1,256	1 512	1 1024	1 2048		
1 22 9 54	11 dias	11 dias	4 4	4	4 4	3 :	2 .	1 1	1 1	1	1 1	1		
2 28 9 54	17 dias	17 dias	4	4 1	4	3 ; 3 ;		1	1 1	1	1	1		
3 6 10 54	25 dias	25 dias	4.1	4 4	4	3 ;	3	2 2	1 1	1 1	1	1		

Quadro demonstrativo das reações de hemaglutinação com o vírus da gripe (amostra PR8), depois de submetido à ação oligodinâmica da prata, em comparação com as testemunhas. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem a +, ++, ++ . Experiência n.º 8.

Experiência n.º 9, de 30 de agosto a 5 de setembro de 1955.

Foram colocadas em ambas as moringas como nos casos anteriores e mais em balão de vidro partes iguais de líquido alantóide contendo vírus da gripe, amostra DL Rio e, em número igual de moringas, o *Micrococcus pyogenes* morto pela ação oligodinâmica no que foi colocado na moringa contendo prata e vivo no da moringa comum. Em balão de vidro, sem as bactérias. Êste mesmo material serviu para a experiência n.º 6. Em nenhum caso observou-se alteração do poder hemaglutinante, conforme demonstra o quadro n.º 6.

QUADRO 6

SÉRIE E DATA	TEMPO PERMAI	TÍTULO HEMAGLUTINANTE											
			1 4	1 8	1, 16	1 32	1 64	1 128	1 256	1 512	1 1024	1 2048	
	Com prata	Sem prata		1								! !	
1 30 8 55		5 dias** 5 dias*	4	4	4	3	2 2	1	1 1	1	1	1	
	5 dias*** 5 dias***	5 dias***	4 · 4 · 4 ·	4 (4 : 4	4 4 4	$egin{array}{c} 3 \ 3 \ 3 \end{array} ar{aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa$	2 2 2	. 1 . 1 . 1 .	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1	
$\frac{2}{5/9},55$	- 10 dias*	10 dias** 10 dias*	4	1 1	4 4 4	3 3 3	2 2 2	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1	; , 1 , 1	
	- 10 dias***	10 das***	4	4	4	$\begin{bmatrix} 3 \\ 3 \end{bmatrix}$	2 2	1	1	1	1 1	i 1	

Quadro demonstrativo das reações de hemaglutinação com o vírus da gripe (amostra DL Rio), depois de submetido à ação oligodinâmica da prata, em comparação com as testemunhas. Experiência n.º 9.

- * Só vírus.
- ** Recipiente de vidro. Só vírus.
- *** Liquido contendo virus e Micrococcus pyogenes.

RESUMO E CONCLUSÕES

Tentamos verificar, em algumas séries de experiências a ação oligodinâmica da prata sôbre o vírus da gripe, tipo A, amostra PR8 e tipo A-primo, amostra DL Ric empregando, para tal fim, recipientes, ora recobertos internamente, em delgadíssima camada, pela prata metálica ora contendo-a, sob a forma de pó, de mistura com o próprio material que constitui as paredes do frasco. Neste foi colocado o líquido alantóide contendo vírus verificando-se, de tempos em tempos, o seu poder patogênico para camundongos brancos e a persistência do seu poder hemaglutinante. Pelos resultados acima expostos vê-se que o referido vírus nada sofreu pela ação oligodinâmica da prata, nas condições experimentais descritas ao passo que, concomitantemente a mesma teve efeito ràpidamente mortal para bactérias pertencentes às espécies Micrococcus pyogenes e Escherichia coli. Assim sendo, logo se destaca a importância do fenômeno observado sabendo-se, além do mais, que a ação oligodinâmica, letal ou nociva, se tem verificado sôbre os sêres vivos em geral. Verificamos ainda, no decorrer dessas experiências, que a junção de bactérias não alterou a atividade do vírus quer as mesmas se encontrassem vivas quer mortas.

As nossas pesquisas prosseguem com outros vírus, os mais diversos, cumprindo-nos salientar, desde logo, que o processo poderá ser empregado para o isolamento dêsses agentes conforme já o verificamos para o da gripe, em experiência acima descrita. Será uma das decorrências práticas da observação que fizemos, dependendo, as demais, de puro interêsse biológico, de investigações subsequentes, baseadas na observação inicial que ora apresentamos.

RESISTENCE OF THE INFLUENZA VIRUS TO THE SILVER OLIGODYNAMIC ACTION

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In some experiments we tried to verify the silver oligodynamic action upon the influenza vírus, A type, PR8 strain and A-prime, DL Rio strain. In the tests we used clay pitchers covered in the inside part with a thin layer of silver or with powdered silver mixed into the clay material. The infected allantoic fluid was put into the pitcher and the pathogenic power for mice and the hemagglutination reaction verified at regular intervals. The results expressed in the tables indicated that no alterations were presented by the virus in comparison with the controls. Experiments made with *Micrococcus pyogenes* and *Escherichia coli* suspensions put into the pitchers with silver showed that the bacteria died in 24 to 48 hours. The reported phenomenon is important because we know that the oligodynamic effect is observed upon microorganisms like bacteria, protozoa and other living beings. The alive or dead bacteria didn't alter the referred properties of the virus.

We are stil investigating the phenomenon with other viruses and, now, we emphasize that it can be applied for the isolation of viruses as we verified for the influenza virus. This will be one of their practical applications. We think that many others, from the biologic point of view, may arise based on our first observation here presented.