

# Uporaba protivirusne ustne vode kot ovire pri prenosu SARS-CoV-2 pri odraslih z asimptomatskim do blagim covidom-19: multicentrično, randomizirano, dvojno slepo nadzorovano preskušanje

Florence Carrouel<sup>1,\*</sup>, Martine Valette<sup>2</sup>, Emilie Gadea<sup>3,4</sup>, Aurelie Esparcieux<sup>5</sup>, Gabriela Illes<sup>6</sup>, Marie Elodie Langlois<sup>7</sup>, Herve Perrier<sup>8</sup>, Claude Dussart<sup>1</sup>, Paul Tramini<sup>9</sup>, Melina Ribaud<sup>10</sup>, Maude Bouscambert-Duchamp<sup>2</sup>, Denis Bourgeois<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorij za sistemsko zdravstveno varstvo, EA4129, Univerza v Lyonu, Univerza Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Francija

<sup>2</sup> Laboratorij za virologijo, Inštitut za infekcijske agense, Nacionalni center za viruse okužb dihal, Bolnišnica Croix-Rousse, Hospices Civils of Lyon, Lyon, Francija

<sup>3</sup> Skupina SNA-EPIS, EA4607, Univerza Jean Monnet, Saint-Etienne, Francija

<sup>4</sup> Enota za klinične raziskave, Bolnišnični center Emile Roux, le Puy-en-Velay, Francija

<sup>5</sup> Oddelek za interno medicino in infekcijske bolezni, Protestantska bolnišnica, Caluire-et-Cuire, Francija

<sup>6</sup> Oddelek za interno medicino in infekcijske bolezni, Medobčinski bolnišnični center »Mont de Marsan et du Pays des Sources«, Mont de Marsan, Francija

<sup>7</sup> Oddelek za interno medicino in infekcijske bolezni, Bolnišnica Saint Joseph Saint Luc, Lyon, Francija

<sup>8</sup> Enota za klinične raziskave, Protestantska bolnišnica, Lyon, Francija

<sup>9</sup> Oddelek za javno zdravje, Fakulteta za zobozdravstvo, Univerza v Montpellieru, Montpellier, Francija

<sup>10</sup> Nacionalni inštitut za agronomske raziskave (INRAE), BioSP, UR546, Avignon, Francija

## IZVLEČEK INFORMACIJE O ČLANKU

Zgodovina članka:

Prejet 15. marca 2021

Prejet v revidirani obliki 10. maja 2021

Sprejet 14. maja 2021

Objavljen na spletu 24. maja 2021

Urednik: A. Huttner

**Ključne besede:**

b-ciklodekstrin

Citrox

Koronavirusna bolezen 2019

Ustna vodica

Slina

Virusna obremenitev s hudim

akutnim respiratornim

sindromom koronavirus-2

**Cilji:** Ugotoviti, ali lahko komercialno dostopna ustna voda s p-ciklodekstrinom in Citroxom (bioflavonoidi) (CDCM) zmanjša virusno obremenitev slin s hudim akutnim respiratornim sindromom koronavirus-2 (SARS-CoV-2).

**Metode:** V to randomizirano nadzorovano preskušanje so bili vključeni bolniki s hudim akutnim respiratornim sindromom koronavirus-2 (SARS-CoV-2), pozitivni na PCR, stari od 18 do 85 let, z asimptomatskimi do blagimi simptomi koronavirusne bolezni 2019 (covid-19), ki so trajali < 8 dni. Skupno 176 primernih bolnikov je bilo naključno dodeljenih (1 : 1) CDCM ali placebo. Tri izpiranja dnevno so izvajali 7 dni. Vzorec slin je bilo opravljeno prvi dan ob 9.00 (T1), 13.00 (T2) in 18.00 (T3). Naslednjih 6 dni je bil en vzorec odvzet ob 15.00. Za odkrivanje SARS-CoV-2 je bil uporabljen kvantitativni test RT-PCR.

**Rezultati:** Analiza namena zdravljenja je pokazala, da je bil CDCM v enem dnevu bistveno učinkovitejši od placeba 4 ure po prvem odmerku ( $p$  0,036), z mediano odstotka ( $\log_{10}$  kopij/ml) zmanjšanja T1–T2  $-12,58$  % (IQR  $-29,55$  % do  $-0,16$  %). Pri drugem odmerku se je ohranila nizka mediana vrednosti CDCM ( $3,08 \log_{10}$  kopij/ml; IQR 0–4,19), v primerjavi s placebom ( $3,31 \log_{10}$  kopij/ml; IQR 1,18–4,75). Na 7. dan se je mediana odstotka ( $\log_{10}$  kopij/ml) virusne obremenitve v slini sčasoma še vedno bolj zmanjšala v skupini CDCM ( $-58,62$  %; IQR  $-100$  % do  $-34,36$  %) v primerjavi s skupino s placebom ( $-50,62$  %; IQR  $-100$  % do  $-27,66$  %). Ti rezultati so bili potrjeni z analizo po protokolu.

**Zaključki:** Ta raziskava potrjuje pomembnost uporabe CDCM na 1. dan (4 ure po prvem odmerku) za zmanjšanje virusne obremenitve SARS-CoV-2 v slini. Pri dolgoročnem učinku (7 dni) se zdi, da CDCM v primerjavi s placebom zagotavlja skromno korist pri zmanjševanju virusne obremenitve v slini. **Florence Carrouel, Clin Microbiol Infect 2021;27:1494**

© 2021 Avtor(ji). V imenu Evropskega združenja za klinično mikrobiologijo in nalezljive bolezni izdal Elsevier Ltd. To je članek z odprtim dostopom pod licenco CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Uvod

Hudi akutni respiratorni sindrom koronavirus-2 (SARS-CoV-2) se lahko prenaša s slino, tudi pri bolnikih, ki ne kašljajo ali nimajo drugih respiratornih simptomov [1,2]. SARS-CoV-2 je identificiran v 91,7 % vzorcev slin posameznikov s koronavirusno boleznijo 2019 (covid-19), obremenitev pa lahko doseže do  $1,2 \times 10^8$  kopij/ml [3–5]. Ko oseba kiha, se pogovarja, diha ali kašlja, nastanejo kapljice slin, ki vsebujejo mikroorganizme [2]. Velikost teh kapljic in njihova količina sta odvisni od posameznika. Posledično se spreminja tudi tveganje prenosa [2]. Do okužbe med ljudmi, ki so v tesnem stiku (1–3 m), pride prek kapljic slin (> 60 mm) [6]. Prenos med dvema osebamama, ki sta oddaljeni do 7–8 m, je posledica aerosolov z virusom (kapljice < 60 mm) [7,8].

Uporaba ustnih vodiv je »pomožno« zdravljenje, ki je del običajnega zdravljenja ali individualne profilakse, zlasti v ustni votlini. Upoštevanje ustnih vodiv kot sredstev, ki lahko zmanjšajo virusno obremenitev SARS-CoV-2, je izjemno privlačen koncept [9–12]. Vendar ni dokazov *in vivo*, ki bi priporočali ustne vodice za nadzor virusne obremenitve SARS-CoV-2. Med protivirusnimi molekulami, ki jih vsebujejo ustne vodice, bi lahko bili v boju proti SARS-CoV-2 zanimivi vodikov peroksid, b-ciklodekstrin, flavonoidi, eterična olja, cetilpiridinijev klorid ali povidon-jod [9,10,13]. Protivirusno delovanje ustne vodice z b-ciklodekstrinom in Citroxiom (CDCM) v našem preskušanju temelji na b-ciklodekstrinu in Citroxiu (flavonoidi). Te molekule so pokazale protivirusno delovanje proti več virusom [14–20], vendar so dokazi za njihovo delovanje proti SARS-CoV-2 temeljili le na študijah *in silico* [10].

Cilj naše raziskave je bil opisati razvoj virusne obremenitve slin s SARS-CoV-2 pri ambulantnih bolnikih s covidom-19, ki so prejeli ustne vodice s protivirusnimi sredstvi ali brez njih.

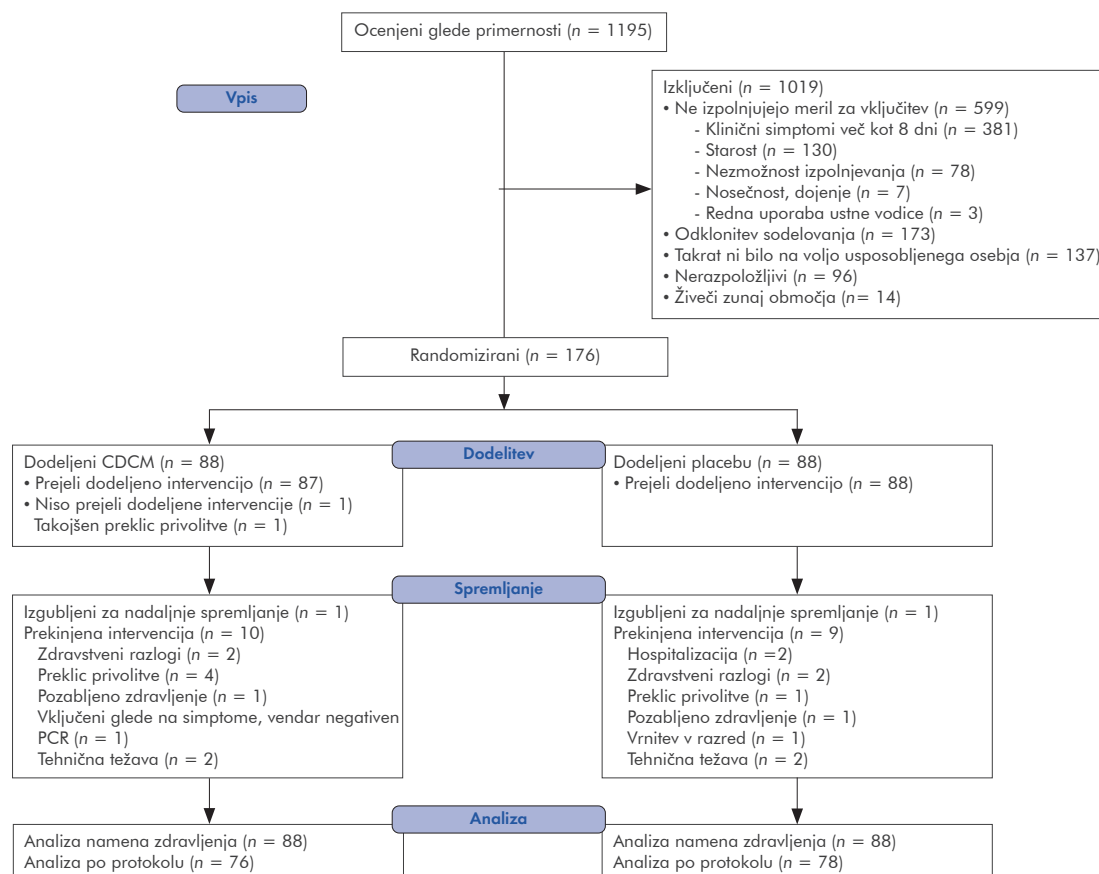
## Materiali in metode

Protokol tega preskušanja je bil objavljen [21] in preskušanje registrirano na ClinicalTrials.gov (NCT04352959).

### Zasnova raziskave

Raziskava je bila multicentrična, dvojno slepa, randomizirana, nadzorovana z dvema vzporednima vejama (1 : 1). Udeleženci so bili vključeni v štirih francoskih bolnišničnih centrih, spremljanje pa je potekalo doma. Od vsakega udeleženca smo pred vključitvijo v raziskavo pridobili pisno privolitev po pojasnilu.

»Odbor za zaščito oseb – Južno Sredozemlje III« (Francija) je pregledal in odobril protokol kliničnega preskušanja.



Slika 1. Profil preskušanja BBCovid.

**Tabela 1.** Izhodiščne značilnosti skupin preizkušanja (analiza namena zdravljenja)

	CDCM	Placebo
Spol, n/N (%)		
Moški	41/88 (46,59 %)	39/88 (44,32 %)
Ženska	47/88 (53,41 %)	49/88 (55,68 %)
Starost (v letih)	n = 88	n = 88
Srednja vrednost ± SD	42,06 ± 14,97	44,08 ± 16,16
Mediana; razpon (IQR)	41,5; 18–76 (30–52)	42; 18–77 (30–56)
Ni komorbidnosti, n/N (%)	65/82 (79,27 %)	65/85 (76,47 %)
Diagnoza do vključitve	n = 87	n = 83
čas (dnevi)		
Srednja vrednost ± SD	3,71 ± 4,11	2,84 ± 1,57
Mediana; razpon (IQR)	4; 0–38 (2–4,5)	3; 0–8 (2–4)
Začetni kraj oskrbe, n/N (%)		
Doma	80/85 (94,12 %)	77/84 (91,67 %)
Bolnišnica	5/85 (5,88 %)	6/84 (7,14 %)
Zdravstvena nega	0/85 (0,00 %)	1/84 (1,19 %)
Diagnostična zamuda do	n = 87	n = 84
1. dne (dnevi)		
Srednja vrednost ± SD	4,3 ± 3,34	3,61 ± 1,48
Mediana; razpon (IQR)	4; 0–31 (3–5)	4; 1–8 (3–5)
Zamuda kliničnih znakov do	n = 76	n = 82
1. dne (dnevi)		
Srednja vrednost ± SD	5,59 ± 1,54	5,46 ± 1,67
Mediana; razpon (IQR)	6; 2–9 (4,75–7)	6; 1–9 (4,25–7)
Zamuda PCR do 1. dne (dnevi)	n = 85	n = 84
Srednja vrednost ± SD	4,11 ± 1,53	3,73 ± 1,45
Mediana; razpon (IQR)	4; 1–8 (3–5)	4; 0–8 (3–5)

Kratice: CDCM – ustna vodica s p-ciklodekstrinom in Citroxiom; IQR – medkvartilni razpon; SD – standardni odklon.

Raziskava je bila opravljena v skladu z načeli Helsinške deklaracije.

## Udeleženci

Populacijo so predstavljali pokretni odrasli z asimptomatskimi in blagimi kliničnimi simptomi covid-19, ki so se prostovoljno zglasili v bolnišnici za presejalni kvalitativni test PCR. Asimptomatski bolniki so opredeljeni kot posamezniki brez kliničnih znakov, medtem ko blagi ustrezajo ambulantnim bolnikom in bolnikom s kliničnimi simptomi brez znakov pljučnice na slikovnih izvidih [22].

Upravičeni so bili odrasli, stari od 18 do 85 let, s klinično diagnozo okužbe s covidom-19, asimptomatskimi ali blagimi kliničnimi simptomi, ki so bili prisotni < 8 dni, virološko potrditivo, razumevanjem in sprejemanjem raziskave ter pisnim soglasjem za sodelovanje v raziskavi.

Merila za izključitev so bila nosečnost, dojenje, nezmožnost upoštevanja protokola, pomanjkanje pisnega soglasja, redna uporaba ustne vodice (več kot enkrat na teden), nezmožnost odgovarjanja na vprašanja in nesodelovanje.

## Randomizacija in zaslepitev

Primerni bolniki so bili naključno (1 : 1) razvrščeni v skupino CDCM ali skupino s placebom. Zaporedje randomizacije s permutacijskimi bloki velikosti 4 je bilo pripravljeno s programom e-CRF Voozalyon 1.3 (Voozanyo, Caluire, Francija) (glej Dodatno gradivo, Dodatek S1).

Po vpisu so udeleženci prejeli vsak po tri 200-mililitrske stekleničke z zdravili. Vsaka viala je vsebovala ustno vodico s protivirusnima sestavinama (b-ciklodekstrin (0,1 %) in Citrox (0,01 %)) ali placebo, ki je imela podoben videz in vsebino, vendar brez zgoraj omenjenih protivirusnih sestavin; oznake na vialah so bile enake. Vsi udeleženci, preiskovalci, statistiki in laboratorijsko osebje so bili «zaslepljeni» glede vial in dodelitve zdravljenja.

## Postopki

Udeleženci so bili poučeni, da trikrat na dan (ob 9.00, 14.00 in 19.00) uporabijo ustno vodico s 30 ml CDCM ali placebo, oboje je dobavilo podjetje Curaden AG (Kriens, Švica) za 1 minuto (glej Dodatno gradivo, slika S1). Udeleženci so bili poučeni, da so jim s pomočjo kompleta »Saliva Collection System« (Greiner Bio-one, Kremsmunster, Avstrija) usposobljene medicinske sestre odvzele slino. Vzorčenje slin je bilo opravljeno prvi dan ob T1 (ob 9.00, pred prvim izpiranjem ustne votline) ter nato ob T2 (ob 13.00) in T3 (ob 18.00). Naslednjih šest dni je bil vzeti le en vzorec ob 15.00. Razlog za izvedbo vzorčenja čiste slin pred in ne po ustni vodici je bil v tem, da se zbere količina virusne obremenitve, ki se je nabrala v prejšnjih urah po predhodnem izpiranju.

Odkrivanje in kvantifikacija RNA SARS-CoV-2 sta bila opravljena v laboratorijih Nacionalnega referenčnega centra za respiratorne viruse (Lyon, Francija) (glej Dodatno gradivo, Dodatek S1 in tabela S1). Virusna obremenitev v slini je bila izračunana kot število kopij RNK na ml slin.

## Rezultati

Primarni rezultati so vključevali spremembe glede na izhodiščno vrednost SARS-CoV-2 v vzorcih slin v dveh časovnih točkah, 4 in 9 ur, v enem dnevu po prvem vnosu. Sekundarni rezultati so vključevali spremembe glede na izhodiščno vrednost SARS-CoV-2 v vzorcih slin 6 dni po prvem odmerku.

## Statistična analiza

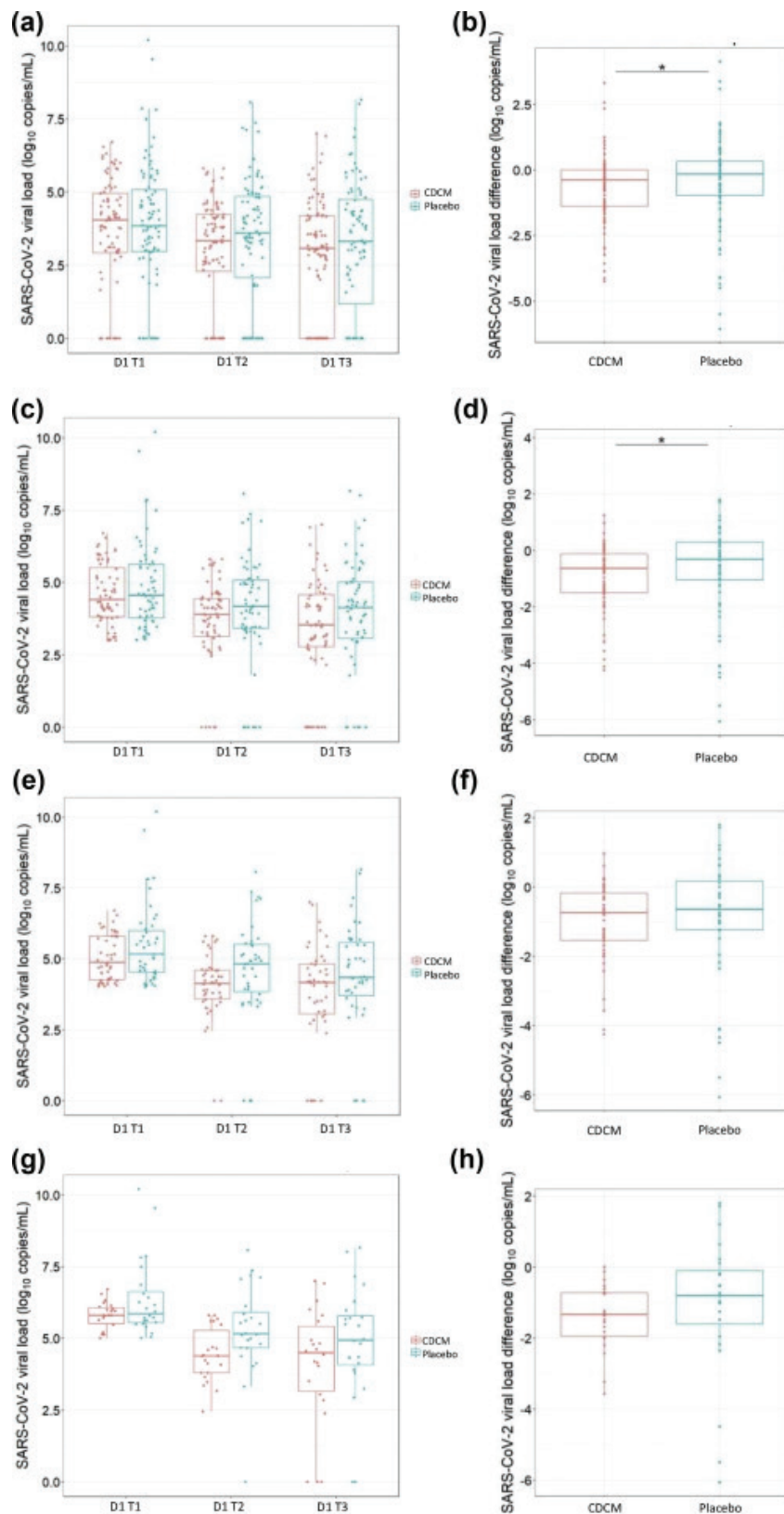
Izračuni velikosti vzorcev so bili ocenjeni z uporabo brezplačnega programa STPLAN (različica 4.5, Department of Biomathematics, University of Texas MD, ZDA). Velikost vzorca je temeljila na minimalni razliki virusne obremenitve  $1 \log_{10}$  kopij/ml med skupinama s placebom in CDCM, skupnem standardnem odklonu  $2 \log_{10}$  kopij/ml, moči 0,9 in napaki tipa I 5 %. Izračunano je bilo, da bi bilo potrebnih vsaj 70 posameznikov na skupino. Pri ocenjeni 25-odstotni stopnji izstopa je bilo potrebnih 88 posameznikov na skupino (enostranski test).

Analize namena zdravljenja so bile izvedene na vnesenih podatkih vseh randomiziranih bolnikov z uporabo večkratne imputacije z verižnimi enačbami, ki temelji na algoritmu Monte Carlo-Markovske verige ob hipotezi o naključno manjkajočih podatkih. Izvedli smo parni neparametrični Wilcoxonov podpisani rang test z Bonferronijevim popravkom, s katerim smo primerjali zmanjšanje virusne obremenitve skozi čas: T1 proti T2, T1 proti T3 in T1 proti 7. dnevu v obeh skupinah. Nato smo obe skupini primerjali ob vsakem času z neparametričnim Mann-Whitneyjevim U-testom. Nazadnje je bil izveden linearni model z mešanim učinkom (ponavljajoči se podatki o virusni obremenitvi vzdolž časa od T1 1. dne do 7. dne) s skupino (CDCM/placebo) kot fiksnim učinkom in posamezniki kot naključnim učinkom.

Poleg tega je bila na podlagi udeležencev s popolnim naborom podatkov o izidu na 1. dan izvedena analiza po protokolu z uporabo iste metodologije kot analize namena zdravljenja.

Post hoc analize podskupin so bile izvedene na podatkovnih nizih z vrednostmi T1 prvega dne, ki so se začele v prvem kvartilu (Q1, izhodiščna virusna obremenitev bolnikov  $> 2,94 \log_{10}$  kopij/ml (namen zdravljenja) ali  $2,95 \log_{10}$  kopij/ml (po protokolu)), drugem kvartilu (Q2, izhodiščna virusna obremenitev bolnikov  $> 4,01 \log_{10}$  kopij/ml;  $4,12 \log_{10}$  kopij/ml (po protokolu)) in tretjem kvartilu (Q3, izhodiščna virusna obremenitev bolnikov  $> 5,03 \log_{10}$  kopij/ml;  $> 5,16 \log_{10}$  kopij/ml (po protokolu)).

Razen Mann-Whitneyjevega U-testa so drugi testi temeljili na enostranski hipotezi ( $H_1: \text{CDCM} < \text{placebo}$ ). Vse analize, razen izračunov velikosti vzorca in grafičnih prikazov, so bile opravljene z uporabo programa R (različica 3.6.0, The R Foundation for Statistical Computing Platform).



**Slika 2.** Razvoj obremenitve sline s hudim akutnim respiratornim sindromom koronavirus-2 (SARS-CoV-2) v kohortah z ustno vodico na 1. dan (analiza namena zdravljenja). (a) Razvoj pri vseh bolnikih. (b) Razlika v virusni obremenitvi SARS-CoV-2 med T1 in T2 za vse bolnike. (c) Razvoj pri bolnikih z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 2,94 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (d) Razlika v virusni obremenitvi SARS-CoV-2 med T1 in T2 za bolnike z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 2,94 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (e) Razvoj pri bolnikih z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 4,01 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (f) Razlika v virusni obremenitvi SARS-CoV-2 med T1 in T2 za bolnike z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 4,01 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (g) Razvoj pri bolnikih z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 5,03 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (h) Razlika v virusni obremenitvi SARS-CoV-2 med T1 in T2 za bolnike z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 5,03 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne.

**Tabela 2.** Razvoj obremenitve sline z virusom SARS-CoV-2 v skupinah s CDCM in placebo (analiza namena zdravljenja)

	CDCM	Placebo	p vrednost <sup>a</sup>
Splošno	<i>n</i> = 88	<i>n</i> = 88	
T1 1. dan			
Mediana (IQR)	4,05 (2,94–4,96)	3,85 (2,97–5,08)	
T2 1. dan	<i>n</i> = 88 (ID = 7)	<i>n</i> = 88 (ID = 5)	
Mediana (IQR)	3,33 (2,29–4,23)	3,60 (2,07–4,83)	
Razlika v mediani T1–T2 (IQR)	–0,38 (–1,39 do 0,00)	–0,15 (–0,97 do 0,33)	0,036
p vrednost <sup>b</sup>	> 0,001	0,039	
% znižanja mediane T1–T2 (IQR)	–12,58 % (–29,55 % do –0,16 %)	–6,74 % (–21,16 % do 10,44 %)	
T3 1. dan	<i>n</i> = 88 (ID = 11)	<i>n</i> = 88 (ID = 7)	
Mediana (IQR)	3,08 (0–4,19)	3,31 (1,18–4,75)	
Razlika v mediani T1–T3 (IQR)	–0,24 (–1,55 do 0,06)	–0,30 (–1,23 do 0,22)	0,270
p vrednost <sup>b</sup>	< 0,001	0,002	
% znižanja mediane T1–T3 (IQR)	–10,67 % (–37,30 % do 3,25 %)	–9,79 % (–28,53 % do 9,21 %)	
7. dan	<i>n</i> = 88 (ID = 14)	<i>n</i> = 88 (ID = 19)	
Mediana (IQR)	0 (0–1,34)	1,62 (0–1,70)	
Razlika v mediani T1–7. dan (IQR)	–2,07 (–4,03 do –0,50)	–2,11 (–3,35 do –0,86)	0,388
p vrednost <sup>b</sup>	< 0,001	< 0,001	
% znižanja mediane T1–7. dan (IQR)	–58,62 % (–100 % do –34,36 %)	–50,62 % (–100 % do –27,66 %)	
Povprečna razlika	–0,17 (90 % CI –0,39 do 0,06)		
MLM p vrednost <sup>c</sup>	0,112		

Kratice: CDCM – ustna vodica z b-ciklodekstrinom in Citroxom; ID – imputacijski podatki; IQR – medkvartilni razpon; MLM – mešani linearni model; SARS-CoV-2 – hudi akutni respiratorni sindrom koronavirus-2.

Podatki so izraženi v log<sub>10</sub> kopij/ml sline ali v % za % variacije, izračunane z vrednostmi, izraženimi v log<sub>10</sub> kopij/ml.

<sup>a</sup> Mann-Whitneyjev U-test razlik z enostransko alternativno hipotezo (H1 CDCM < placebo).

<sup>b</sup> Wilcoxonov test predznačenih rangov za ugotavljanje razlik.

<sup>c</sup> Mešani linearni model koncentracij skozi čas z enostransko alternativno hipotezo (H1 CDCM < placebo).

## Rezultati

### Zasnova raziskave in nabor analiz

To preskušanje [21] je bilo izvedeno med 9. junijem in 11. decembrom 2020. Od 1195 izbranih bolnikov jih je 176 izpolnjevalo merila za vključitev in so bili randomizirani. Ti bolniki so predstavljali populacijo z namenom zdravljenja (slika 1). Izhodiščne značilnosti obeh skupin so bile podobne (tabela 1). Povprečna starost je bila 43,06 ± 5,56 leta, od 18 do 77 let; 80/176 (45,45 %) bolnikov je bilo moških. Skupno 157/169 (92,90 %) je bilo ambulantnih bolnikov, 130/167 (77,84 %) udeležencev pa je bilo brez zgodovine zdravljenja. Med udeleženci je bilo 15/175 (8,57 %) asimptomatskih, 160/175 (91,43 %) pa je imelo blage simptome, pri čemer je bilo na obrazcih za poročanje covid-19 navedenih 3,58 ± 2,25 simptomov. Udeleženci so bili randomizirani v 4 dneh (interkvartilni razpon (IQR) 3–5 dni) od pojava simptomov. Prvi vzorci sline so bili odvzeti v srednjem času 4 dni (IQR 3–5 dni) po nazofaringealnih pozitivnih rezultatih PCR. Mediana začetne virusne obremenitve je bila 4,01 log<sub>10</sub> kopij/ml (IQR 2,94–5,03 log<sub>10</sub> kopij/ml, razpon 0–10,19 log<sub>10</sub> kopij/ml). Prvi kvartil (Q1) je ustrezal virusni obremenitvi z začetno vrednostjo 2,94 log<sub>10</sub> kopij/ml, drugi kvartil (Q2) je ustrezal virusni obremenitvi z začetno vrednostjo 4,01 log<sub>10</sub> kopij/ml, tretji kvartil (Q3) pa virusni obremenitvi z začetno vrednostjo 5,03 log<sub>10</sub> kopij/ml.

### Sprememba virusne obremenitve sline SARS-CoV-2 v prvem dnevu pri vseh bolnikih

Virusna obremenitev sline SARS-CoV-2 se je med T1–T2 in T2–T3 v skupini CDCM in skupini s placebo nenehno zmanjševala (slika 2). Mediana virusne obremenitve je bila v skupini CDCM v primerjavi s skupino s placebo v T2 in T3 nižja. V primerjavi pred in po je bila opažena pomembna razlika v zmanjšanju virusne obremenitve pri istih bolnikih, ki so prejeli CDCM, v primerjavi s skupino s placebo brez razlike med T1 in T2 (p 0,036) (tabela 2). Odstotek mediane zmanjšanja (log<sub>10</sub> kopij/ml) je bil –12,58 % (IQR –29,55 % do –0,16 %) za CDCM v primerjavi z –6,74 % (IQR –21,16 % do 10,44 %) za placebo. Pri T3 je bilo zmanjšanje virusne obremenitve v slini pri obeh skupinah v primerjavi s T1 znatno (CDCM: p < 0,001; placebo: p 0,002). Vendar med obema skupinama ni bilo ugotovljenih pomembnih razlik. Podobni rezultati so bili dobljeni z analizo po protokolu (glej Dodatno gradivo, tabele S2, S3 in S4 ter sliko S2).

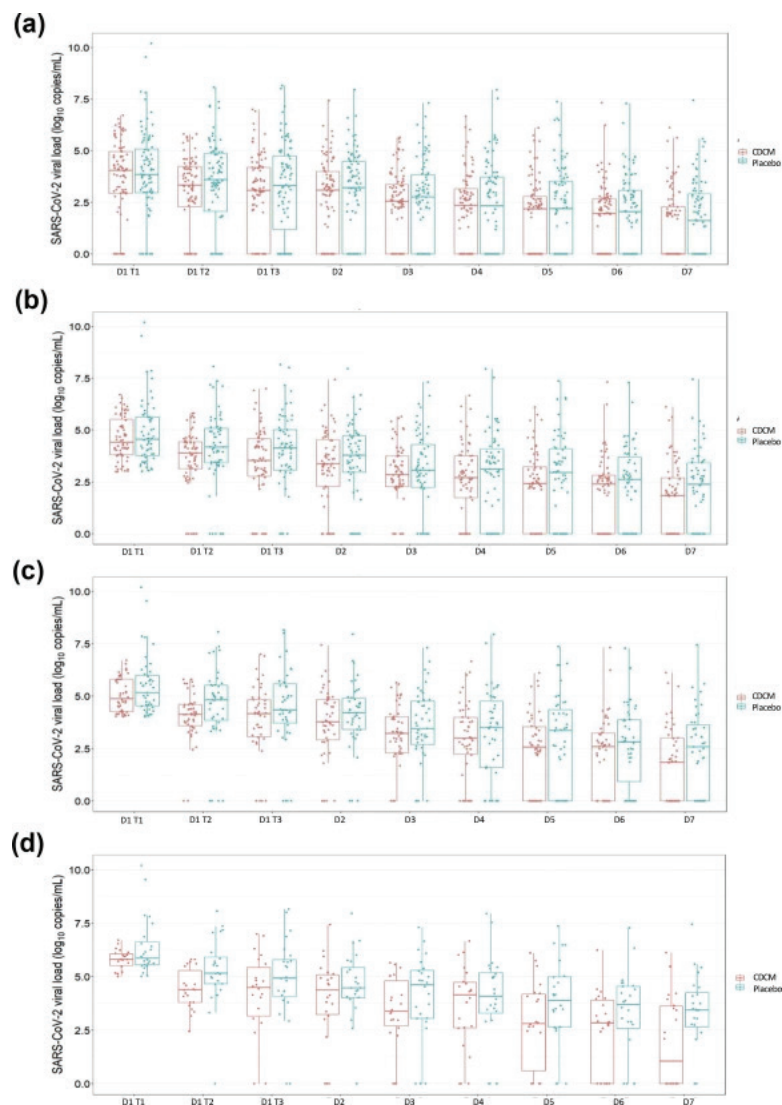
## Sprememba virusne obremenitve sline SARS-CoV-2 v prvem dnevu na podlagi izhodiščne virusne obremenitve bolnikov

Časovni rezultati na 1. dan glede na začetno obremenitev sline so bili analizirani v treh podskupinah na podlagi kvartilov. Opisni rezultati in kvantitativni rezultati so predstavljeni na sliki 2 in v Dodatnem gradivu (tabela S5).

Pri bolnikih z začetno obremenitvijo sline s SARS-CoV-2 > 2,94 log<sub>10</sub> kopij/ml je bila med T1 in T2 pomembna razlika v zmanjšanju virusne obremenitve. CDCM je imel učinek, placebo pa ne (p 0,036). Virusna obremenitev sline se je v obdobju T1–T3 pomembno zmanjšala pri obeh skupinah, vendar je bil pozitivnejši učinek (log<sub>10</sub> kopij/ml) pri skupini CDCM (–15,74 %, IQR –38,53 % do –1,48 % za CDCM v primerjavi z –10,84 %, IQR –28,65 % do 3,82 % za placebo).

Pri bolnikih z začetno obremenitvijo sline s SARS-CoV-2 > 4,01 log<sub>10</sub> kopij/ml rezultati niso pokazali pomembne razlike med CDCM in placebo pri T2 (p 0,182) ali T3 (p 0,257). Srednji odstotek zmanjšanja (log<sub>10</sub> kopij/ml) med T1 in T3 je bil –16,35 % za CDCM (IQR –37,42 % do –3,56 %) in –12,30 % za placebo (IQR –27,19 % do 1,53 %).

Pri bolnikih z začetno obremenitvijo sline s SARS-CoV-2 > 5,03 log<sub>10</sub> kopij/ml kvantitativni rezultati v obdobjih T1–T2 in T1–T3 niso pokazali pomembne razlike med obema skupinama. Mediana odstotka zmanjšanja (log<sub>10</sub> kopij/ml) v obdobju T1–T3 je bila –24,14 % za CDCM (IQR –41,05 % do –4,49 %) in –14,15 % za placebo (IQR –27,71 % do –4,21 %). Podobni rezultati so bili dobljeni pri analizi po protokolu (glej Dodatno gradivo, tabela S6).



**Slika 3.** Razvoj obremenitve sline s hudim akutnim respiratornim sindromom koronavirus-2 (SARS-CoV-2) v kohortah z ustno vodico od 1. do 7. dneva (analiza namena zdravljenja). (a) Razvoj pri vseh bolnikih. (b) Razvoj pri bolnikih z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 2,94 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (c) Razvoj pri bolnikih z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 4,01 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne. (d) Razvoj pri bolnikih z virusno obremenitvijo SARS-CoV-2 > 5,03 log<sub>10</sub> kopij/ml ob T1 1. dne.

## Sprememba virusne obremenitve sline SARS-CoV-2 po sedmih dneh pri vseh bolnikih

Spremembe količine SARS-CoV-2 v vzorcih sline po 7 dneh glede na izhodiščno vrednost so bile analizirane glede na namen zdravljenja.

V skupini CDCM in skupini s placebom je bilo ugotovljeno stalno zmanjševanje v 7 dneh (slika 3). Na 7. dan ni bilo opaziti bistvene razlike med bolniki, ki so prejeli CDCM, in tistimi, ki so prejeli placebo ( $p = 0,388$ ) (tabela 2 in glej Dodatno gradivo, tabela S4). V obeh skupinah je bila virusna obremenitev na 7. dan pomembno nižje kot ob T1 1. dne ( $p < 0,001$ ). Z linearnim mešanim modelom je bilo v skupini CDCM opaženo večje, vendar neznačilno ( $p = 0,112$ ) zmanjšanje virusne obremenitve (povprečna razlika  $-0,17 \log_{10}$  kopij/ml, 90 % CI  $-0,39$  do  $0,06$ ). Podobni rezultati so bili dobljeni pri analizi po protokolu (glej Dodatno gradivo, tabela S4, sliki S3 in S4).

## Sprememba virusne obremenitve sline SARS-CoV-2 po sedmih dneh na podlagi izhodiščne virusne obremenitve bolnikov

Sedmi dan je bila mediana virusne obremenitve sline v skupini CDCM vedno nižja kot v skupini s placebom (slika 3). Bistvenih razlik med obema skupinama ni bilo opaziti (tabela 2). Pri začetni obremenitvi sline  $> 5,03 \log_{10}$  kopij/ml je bila mediana odstotka zmanjšanja ( $\log_{10}$  kopij/ml) na 7. dan v primerjavi z obremenitvijo ob T1 za skupino CDCM v primerjavi s skupino s placebom  $-84,28$  % (IQR  $-100$  % do  $-36,52$  %) proti  $-44,20$  % (IQR  $-59,59$  % do  $33,61$  %). Z linearnim mešanim modelom je bilo pri bolnikih z začetno virusno obremenitvijo  $> 4,01 \log_{10}$  kopij/ml v skupini CDCM opaženo pomembnejše zmanjšanje virusne obremenitve; povprečna razlika  $-0,25 \log_{10}$  kopij/ml (90 % CI  $-0,47$  do  $-0,04$ ;  $p = 0,028$ ). Podobno je analiza bolnikov z začetno virusno obremenitvijo  $> 5,03 \log_{10}$  kopij/ml pokazala povprečno razliko v skupini CDCM v primerjavi s skupino s placebom  $-0,36 \log_{10}$  kopij/ml (90 % CI  $-0,64$  do  $0,08$ ;  $p = 0,019$ ). Podobne rezultate smo dobili z analizo po protokolu (glej Dodatno gradivo, tabela S5, sliki S3 in S4).

## Razprava

Primarna končna točka je pokazala učinek CDCM v primerjavi s placebom. Enkratno izpiranje s CDCM je znatno zmanjšalo tveganje okužbe s SARS-CoV-2 iz sline. V enem dnevu je prvi odmerek izpiranja CDCM v primerjavi s placebom znatno zmanjšal virusno obremenitev, drugi odmerek pa je to nizko vrednost ohranil.

Post-hoc analiza na podlagi izhodiščne virusne obremenitve bolnikov je privedla do več ugotovitev. Prvič, med udeleženci z začetno obremenitvijo  $> 2,94 \log_{10}$  kopij/ml je bilo v skupini CDCM v štirih urah, ki ločijo T2 od T1, opaženo znatno zmanjšanje. Drugič, njihova virusna obremenitev v slini se je v obdobju od T1 do T3 pomembno zmanjšala v obeh skupinah; ne glede na to pa je bil pozitiven učinek v skupini CDCM večji kot v skupini s placebom. Zmanjšanje, opaženo v skupini s placebom, bi lahko razložili z naravnim zmanjšanjem virusne obremenitve sline med dnevom, z učinkom izpiranja ustne votline ali s prisotnostjo pomožnih snovi, ki jih lahko štejemo za morebitne aktivne sestavine [23]. Tretjič, pri bolnikih z začetno obremenitvijo  $> 4,01 \log_{10}$  kopij/ml je bil pri skupini CDCM opažen večji, vendar neznačilen odstotek zmanjšanja virusne obremenitve kot pri skupini s placebom. Ena od hipotez je, da pri udeležencih z najvišjo virusno obremenitvijo pogostost uporabe ustne vodice morda ni zadostna, da bi v kratkem času pomembno vplivala na virusno obremenitev.

Poleg tega je post-hoc analiza na podlagi starosti bolnikov pokazala, da starost ni bila povezana z začetno virusno obremenitvijo ob T1 1. dne (Spearmanov korelacijski test,  $p = 0,07$ ) in niti z razvojem do T1 prvega dne (Spearmanov korelacijski test,  $p = 0,74$ ). Vpliva skozi čas ni bilo opaziti (mešani linearni model,  $p = 0,302$ ).

Glede odzivov na protivirusno obremenitev z ustnimi vodnicami na 7. dan je naša raziskava zagotovila nejasne dokaze za splošno populacijo. Z odpravo učinka nihanja se je v skupini CDCM sčasoma bolj zmanjšala virusna obremenitev v slini. Pri bolnikih z začetno virusno obremenitvijo SARS-CoV-2  $> 4,01 \log_{10}$  kopij/ml ali  $> 5,03 \log_{10}$  kopij/ml je zdravilo CDCM bistveno hitreje zmanjšalo virusno obremenitev sline kot placebo.

Naša raziskava je imela omejitve, povezane s časom, ki je pretekel od prvega odvzema sline do ocene časovnega zamika pri odraslih brez kliničnih simptomov. Pri tridesetih odstotkih okuženih oseb se simptomi nikoli ne pojavijo [24,25]. Ker se zdi, da nalezljivost doseže vrh ob pojavu simptomov ali pred njim, podatki o začetni virusni obremenitvi podcenjujejo koncentracijsko obremenitev sline splošne populacije v inkubacijski dobi [26]. Drugič, v naši raziskavi RCT je bil delež manjkajočih podatkov 12 % (13 % v aktivni skupini; 11 % v kontrolni skupini). Razlogi za manjkajoče podatke – popolnoma naključno manjkajoči podatki, naključno manjkajoči podatki in nenaključno manjkajoči podatki – niso bili navedeni. Tretjič, v obeh skupinah nekateri udeleženci ob T1 1. dne niso imeli obremenitve SARS-CoV-2 (28/176, 15,9 %). Ti podatki so lahko vplivali na moč testov in/ali na vrednosti zmanjšanja virusne obremenitve. Poleg tega se zaradi obdobja nabora (junij–december 2020) pojavlja vprašanje ekstrapolacije rezultatov na variantne seve, ki so se pojavili od takrat.



# Zaključek

CDCM je imel 4 ure po prvem odmerku pomemben pozitiven učinek na zmanjšanje virusne obremenitve SARS-CoV-2 v slini pri odraslih z asimptomatskim ali blagim covidom-19. Za dolgoročni učinek se zdi, da je korist za priporočanje CDMC omejena, čeprav so imela tri dnevna izpiranja ugoden učinek na zmanjšanje virusne obremenitve slin SARS-CoV-2 7 dni po prvem odmerku pri odraslih z visoko virusno obremenitvijo slin ob izhodišču. Zdi se, da CDMC v primerjavi s placebom zagotavlja skromno korist pri zmanjševanju virusne obremenitve v slini.

## Izjava o preglednosti

Vsi avtorji so izpolnili enotni obrazec ICMJE za razkritje informacij. DB poroča o nefinančni in drugi podpori družbe Curaden AG Švica zunaj predloženega dela. Vsi drugi avtorji izjavljajo, da nimajo navzkrižja interesov.

To delo sta delno podprla družba Curaden AG, Kriens, Švica, in Laboratorij za sistemsko zdravstveno varstvo, EA4129, Univerza v Lyonu, Francija. Financer raziskave ni imel nobene vloge pri zasnovi raziskave, zbiranju podatkov, analizi podatkov, razlagi podatkov ali pisanju poročila. Vsi avtorji so imeli popoln dostop do vseh podatkov v raziskavi in so bili končno odgovorni za odločitve o predložitvi v objavo.

## Prispevki avtorjev

FC, DB in CD so predlagali izvirno idejo raziskave. FC je bil koordinator preskušanja. FC, PT, CD in DB so zasnovali preskušanje in protokol raziskave. MV, PT, MR in FC so prispevali k razlagi podatkov, PT, FC, MV in HP pa so podatke preverili. EGD, AE, MEL in GI so bili odgovorni za delo na kraju samem, vključno z zaposlovanjem, spremljanjem in zbiranjem podatkov. HP je spremljal preskušanje. MBD in MV sta bila odgovorna za laboratorijske analize. PT in MR sta opravila glavno analizo. FC in DB sta napisala prvi osnutek rokopisa, CD, MBD, MR, MV in PT pa so prispevali k reviziji rokopisa. Vsi avtorji so članek pred oddajo pregledali in ga sprejeli.

## Dostop do podatkov

Florence Carrouel ima popoln dostop do podatkov in jamči zanje.

## Zahvala

Zahvaljujemo se za prispevek vsem bolnikom in članom ekipe za preskušanje na vsakem mestu zaposlitve. Hvala predvsem naslednjim: Sophie Lengagne, Eva Geraud in Anthea Loiez iz Bolnišničnega centra Emile Roux (le Puy-en-Velay, Francija); Louis Gauthier iz Protestantske bolnišnice (Lyon, Francija), Severine Poupblanc, Anne-Helene Boivin in Jerome Dimet iz Medobčinskega bolnišničnega centra »Mont de Marsan et du Pays des Sources« (Mont de Marsan, Francija) ter Armand Sophie, Caroline Gagneux, Adrien Didelot, Matthieu Pecquet, Marie Paul Perraud in Josiane Thimonier (Cadres des services) iz Bolnišnice Saint Joseph Saint Luc (Lyon, Francija). Zahvaljujemo se tudi vsem tehnikom iz CNR za njihovo delo. Zahvaljujemo se Stephanu Morissetu, neodvisnemu statistiku in posebnemu svetovalcu. Zahvaljujemo se tudi Ericu Bomelu, EZUS, Univerza Lyon1, ki je zagotovil osrednjo administrativno podporo projektu, ter Ursuli Sutter iz podjetja Greiner Bio-One GmbH (St. Gallen, Švica) in Dr. Ericu Gonzalezu Garcii iz podjetja Greiner Bio-One GmbH (Kremsmuenster, Avstrija), ki sta prijazno zagotovila tehnično podporo.

## Dodatek A. Dodatni podatki

Dodatni podatki k temu članku so na voljo na spletni strani <https://doi.org/10.1016Zj.cmi.2021.05.028>.

## Viri in literatura

- [1] Xu R, Cui B, Duan X, Zhang P, Zhou X, Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int J Oral Sci* 2020;12:1—6.
- [2] Baghizadeh Fini M. Oral saliva and COVID-19. *Oral Oncol* 2020;108:104821.
- [3] To KKW, Yip CCY, Lai CYW, Wong CKH, Ho DTY, Pang PKP, et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:372—8.
- [4] To KK-W, Tsang OT-Y, Chik-Yan Yip C, Chan K-H, Wu T-C, Chan JMC, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis* 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.
- [5] Yoon JG, Yoon J, SongJY, Yoon SY, Lim CS, Seong H, et al. Clinical significance of a high SARS-CoV-2 viral load in the saliva. *J Korean Med Sci* 2020;35:e195.
- [6] National Academies of Sciences E. Rapid expert consultation on the possibility of bioaerosol spread of SARS-CoV-2 for the COVID-19 pandemic (April 1, 2020). National Academies Press (US); 2020.
- [7] Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: a critical review on the unresolved dichotomy. *Environ Res* 2020;188:109819.
- [8] Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect* 2020;104:246—51.
- [9] Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Goncalves LS, Dussart C, Llodra JC, et al. COVID-19: a recommendation to examine the effect of mouthrinses with b-cyclodextrin combined with citrox in preventing infection and progression. *J Clin Med* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/jcm9041126>.
- [10] Carrouel F, Goncalves LS, Conte MP, Campus G, Fisher J, Fraticelli L, et al. Antiviral activity of reagents in mouth rinses against SARS-CoV-2. *J Dent Res* 2021;100:124—32.
- [11] O'Donnell VB, Thomas D, Stanton R, Maillard J-Y, Murphy RC, Jones SA, et al. Potential role of oral rinses targeting the viral lipid envelope in SARS-CoV-2 infection. *Function* 2020. <https://doi.org/10.1093/function/zqaa002>.
- [12] Meyers C, Robison R, Milici J, Alam S, Quillen D, Goldenberg D, et al. Lowering the transmission and spread of human coronavirus. *J Med Virol* 2021;93: 1605—12.
- [13] Herrera D, Serrano J, Roldan S, Sanz M. Is the oral cavity relevant in SARS-CoV-2 pandemic? *Clin Oral Investig* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03413-2>.
- [14] Lalani S, Poh CL. Flavonoids as antiviral agents for enterovirus A71 (EV-A71). *Viruses* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/v12020184>.
- [15] Zou M, Liu H, Li J, Yao X, Chen Y, Ke C, et al. Structure-activity relationship of flavonoid bifunctional inhibitors against Zika virus infection. *Biochem Pharmacol* 2020;177:113962.
- [16] Braga SS. Cyclodextrins: emerging medicines of the new millennium. *Bio-molecules* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/biom9120801>.
- [17] Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:534—8.
- [18] Jones ST, Cagno V, Janecek M, Ortiz D, Gasilova N, Piret J, et al. Modified cyclodextrins as broad-spectrum antivirals. *Sci Adv* 2020;6:eaax9318.
- [19] Goncharova EP, Kostyro YA, Ivanov AV, Zenkova MA. A Novel sulfonated derivative of b-cyclodextrin effectively inhibits influenza A virus infection in vitro and in vivo. *Acta Naturae* 2019;11:20—30.
- [20] Braga SS, Barbosa JS, Santos NE, El-Saleh F, Paz FAA. Cyclodextrins in antiviral therapeutics and vaccines. *Pharmaceutics* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030409>.
- [21] Carrouel F, Viennot S, Valette M, Cohen J-M, Dussart C, Bourgeois D. Salivary and nasal detection of the SARS-CoV-2 virus after antiviral mouthrinses (BBCovid): a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* 2020;21:906.
- [22] Gulsen A. Simple classification of COVID-19 patients. *J Lung Pulm Respir Res* 2020;7:62—3.
- [23] Pottel J, Armstrong D, Zou L, Fekete A, Huang X-P, Torosyan H, et al. The activities of drug inactive ingredients on biological targets. *Science* 2020;369: 403—13.
- [24] Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms. *JAMA Netw Open* 2021;4:e2035057.
- [25] Pullano G, Di Domenico L, Sabbatini CE, Valdano E, Turbelin C, Debin M, et al. Underdetection of cases of COVID-19 in France threatens epidemic control. *Nature* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03095-6>.
- [26] He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 2020;26:672—5.

Dostop do raziskave:

[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(21\)00268-8/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(21)00268-8/fulltext)