

Andrej Steyer¹, Tina Mikuletič², Tjaša Cerar Kišek³, Tina Triglav⁴

Virucidna učinkovitost pastil s kombinacijo cetilpiridinijevega klorida in benzdaminijevega klorida na virus influence A

Virucidal Efficacy of Lozenges with a Fixed-dose Combination of Cetylpyridinium Chloride and Benzydamine Hydrochloride Against Influenza A Virus

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cetilpiridinijev klorid, benzdaminijev klorid, virus influence A tipa H3N2, okužba dihal

IZHODIŠČA. Virusi so najpogostejši povzročitelji vnetja žrela. Čeprav se večina okužb dihal konča spontano, bolniki pogosto uporabljajo različne izdelke za samozdravljenje. Pastile s kombinacijo benzdaminijevega klorida (BK) in cetilpiridinijevega klorida (CPK) dokazano učinkovito lajšajo simptome vnetega žrela. Antiseptik CPK so že opisali kot učinkovit baktericid, nekatere raziskave pa potrjujejo njegovo učinkovitost tudi pri določenih virusih z ovojnico. METODE. Namen raziskave je bil preučiti virucidno delovanje CPK ter kombinacije BK in CPK v obliki proste (čiste) učinkovine in v obliki pastil (testne snovi) na virus influence A v pogojih *in vitro*. Testne snovi v suspenzijah različnih koncentracij in virus smo inkubirali 1 minuto, 5 minut ali 15 minut ter ugotavljali količino infektivnih virusov. REZULTATI. Kombinacija BK in CPK v obliki pastile v suspenziji z visoko koncentracijo zniža virusni titer za več kot $4 \log_{10}(c)$ po eni minuti, medtem ko CPK ter BK in CPK kot proste učinkovine podobno znižanje dosežejo po petih minutah. Po 5–15 minutah znižanje virusnega titra za $4 \log_{10}(c)$ dosega še kombinacija BK in CPK v obliki pastile v suspenziji s srednjo koncentracijo. RAZPRAVA. Rezultati testiranja *in vitro* dokazujejo učinkovito, močno virucidno delovanje pastil s kombinacijo BK in CPK na virus influence A.

¹ Dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

² Dr. Tina Mikuletič, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Znan. sod. dr. Tjaša Cerar Kišek, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Asist. Tina Triglav, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: cetylpyridinium chloride, benzydamine hydrochloride, influenza virus A subtype H3N2, respiratory tract infection

BACKGROUND. Viruses are the most common causes of pharyngitis. Although most respiratory infections resolve spontaneously, patients very often use various self-medication therapies. Lozenges with a fixed-dose combination of benzydamine hydrochloride (BH) and cetylpyridinium chloride (CPC) have been shown to be effective in relieving symptomatic sore throat. The antiseptic CPC has already been described as an effective bactericide, and some researches confirm its effectiveness in certain enveloped viruses. **METHODS.** The aim of the study was to investigate the *in vitro* virucidal activity of CPC and the fixed-dose combination of BH/CPC as a free active substance or as a lozenge on influenza A virus. The virus and the suspensions of different concentrations of test substances were incubated for 1 minute, 5 minutes and 15 minutes, and the amount of infectious viruses was determined. **RESULTS.** The fixed-dose combination of BH/CPC in the form of a lozenge in high-concentration suspension reduces the viral titer by $4 \log_{10}(c)$ after only one minute, while in the case of CPC and BH/CPC as free active substances, a similar reduction is achieved only after five minutes. A reduction of the viral titer by $4 \log_{10}(c)$ is also achieved by BH/CPC lozenges in medium-concentration suspension between 5 and 15 minutes. **DISCUSSION.** The results of *in vitro* testing demonstrate effective, potent virucidal activity of BH/CPC lozenges on influenza A virus.

IZHODIŠČA

Izbruh koronavirusa hudega akutnega respiratornega sindroma 2 (angl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) je sprožil intenzivno iskanje in preučevanje učinkovitih metod zdravljenja in preprečevanja okužbe. Pozornost so pritegnili tudi oralni antiseptiki, s katerimi bi morda lahko zmanjšali virusno obremenitev ustne votline in tveganje za prenos okužbe. Med preučevanimi antiseptiki je cetilpiridinijev klorid (CPK), za katerega razpoložljivi znanstveni podatki kažejo najbolj spodbudne rezultate. Ima širok razpon delovanja, saj deluje baktericidno in virucidno (1). V nekaterih kliničnih raziskavah so ugotovili, da ustne vode s CPK lahko zmanjšajo virusno obremenitev s SARS-CoV-2, kar kaže na možno vlogo te učinkovine pri nadzoru koronavirusne bolezni 2019 (angl. *coronavirus disease-19*, COVID-19) (2, 3). CPK kot samostojno učinkovino ali v kombinaciji z drugimi učinkovinami

običajno vsebujejo izdelki za lokalno peroralno uporabo v obliki tekočine za izpiranje ust (grgranje), pastil in pršil.

Virusne okužbe dihal spadajo med najpogostejše bolezni na svetu. Običajno se kažejo s simptomi, kot so vnetje nosne sluznice, kašelj, zvišana telesna temperatura in vnetje žrela. Čeprav se večina okužb dihal konča spontano in ne zahteva posebnega zdravljenja, bolniki zelo pogosto uporabljajo različne izdelke za samozdravljenje, ki lahko blažijo simptome ali odpravijo vzrok okužbe (4).

Pastile s fiksno kombinacijo benzidaminijevega klorida (BK) in CPK so klinično učinkovite pri odpravljanju simptomov vnetega žrela (5). Nedavno je bil v testiranju *in vitro* potrjen tudi njihov virucidni učinek na SARS-CoV-2 (6). Virucidna učinkovitost CPK je dokazana tudi za različne seve virusa influence, saj so s testiranjem *in vitro* dokazali razpad virusne ovojnice ob izpostavitvi tej učinkovini (7).

Z raziskavo, ki smo jo izvedli na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, smo želeli v pogojih *in vitro* potrditi virucidno delovanje pastil s fiksno kombinacijo BK in CPK na virus influence A in hkrati primerjati virucidni učinek CPK ter kombinacije BK in CPK kot prostih učinkovin. Tako smo želeli ovrednotiti možni vpliv ostalih učinkovin (BK) in pomožnih sestavin v pastili na virucidno učinkovitost.

METODE

Testiranje je potekalo skladno z metodami in zahtevami, ki jih določa standard Slovenskega inštituta za standardizacijo za vrednotenje virucidnega delovanja v humani medicini (8). Pogoji testiranja in časi stika so bili izbrani in prilagojeni fizikalno-kemičnim lastnostim ustne votline pri človeku z upoštevanjem dejavnikov, kot so temperatura, sestava (biološka obremenitev) in količina sline, ki nastane med raztapljanjem pastil, ter dinamika raztapljanja pastil (različen čas stika).

Osamitev virusa in kvantifikacija

Testni ortomiksovirus, tj. virus influence A, sev A/Victoria/3/75, tip hemaglutinin 3 nevraminidaza 2 (H3N2), smo pridobili iz Ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection, ATCC), ga predhodno pomnožili v celični kulturi in določili količino virusa. Za gojenje virusa smo uporabili celično linijo Madin-Darbyjevih pasjih ledvičnih (angl. *Madin-Darby canine kidney*, MDCK) celic in najmanjše osnovno gojišče z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma (FGS) in tripsina iz goveje trebušne slinavke (angl. *trypsin from bovine*

pancreas, TPCK) v končni koncentraciji tripsina 2 µg/ml. Koncentracija virusnega izolata je bila določena s Spearman-Kärberjevo metodo (9). Virusnemu sevu smo določili razredčino virusa (izraženo v virusni enoti na mililiter), pri kateri virus okuži 50 % celic v celični kulturi – 50-% odmerek za tkivno kulturo (angl. *median tissue culture infectious dose*, TCID₅₀/ml). Izhodna koncentracija pomnoženega virusa je bila 10^{9,41} TCID₅₀/ml (tabela 1).

Test virucidnosti in nadzorni postopki

Testne snovi smo raztopili v trdi vodi z dodatkom »moteče snovi« (v nadaljevanju suspenzija), da smo ustvarili biološko obremenjene pogoje in simulirali sestavo sline. Suspenzija je bila raztopina govejega serumskega albumina (GSA) (3,0 g/l vode) z eritrociti v koncentraciji 3,0 ml/l. Virusne kulture smo izpostavili testnim snovem pri temperaturi 37 °C za 1 minuto, 5 minut ali 15 minut, kar ustreza povprečnemu času lizanju pastil (5–10 minut). Uporabili smo tri koncentracije testnih snovi, ki smo jih pridobili z raztapljanjem testne snovi v 4 ml (visoka koncentracija), 20 ml (srednja koncentracija) in 30 ml (nizka koncentracija) suspenzije. Testne snovi so prikazane v tabeli 2.

Sočasno s testom virucidnosti vsake od testnih snovi so potekale ustrezne kontrole celic in virusa, virusa v celotnem inkubacijskem času testa, zaviralnega učinka testne snovi v ledeno hladnem celičnem mediju, vpliva testne snovi na dovzetnost celic za virus in njenega citotoksičnega učinka na celice.

Tabela 1. Izhodne koncentracije virusa, uporabljenega pri testiranju. IZ – interval zaupanja, H3N2 – hemaglutinin 3, nevraminidaza 2.

| Testni virus | Oznaka seva | Prvi datum osamitve | log ₁₀ (c) | 95-% IZ |
|-----------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|---------|
| Virus influence A, tip H3N2 | A/Victoria/3/75 | 3. 5. 2021 | 9,41 | ± 0,67 |

Tabela 2. Testne snovi, ki smo jih preizkusili. BK – benzidaminijev klorid, CPK – cetilpiridinijev klorid, E – Evropa, FCF – za obarvanje hrane (angl. *for coloring food*).

| Testna snov | Sestava testne snovi |
|---|--|
| Pastila z BK in CPK, evkalipt (pastila Septabene®) | 3 mg BK, 1 mg CPK, evkaliptovo olje, levomentol, citronska kislina (E 330), sukraloza (E 955), izomalt (E 953), briljantno modro FCF (E 133) |
| Pastila s placebom, evkalipt | evkaliptovo olje, levomentol, citronska kislina (E 330), sukraloza (E 955), izomalt (E 953), briljantno modro FCF (E 133) |
| Pastila z BK in CPK (pastila Septabene®), limona, med | 3 mg BK, 1 mg CPK, eterično olje poprove mete, levomentol, sukraloza (E 955), citronska kislina (E 330), izomalt (E 953), aroma limone, aroma medu, kurkumin (E 100), natrijev benzoat (E 211) |
| Pastila s placebom, limona, med | eterično olje poprove mete, levomentol, sukraloza (E 955), citronska kislina (E 330), izomalt (E 953), aroma limone, aroma medu, kurkumin (E 100), natrijev benzoat (E 211) |
| CPK kot prosta učinkovina | 1 mg CPK |
| BK in CPK kot prosti učinkovini | 3 mg BK, 1 mg CPK |

REZULTATI

Rezultati kontrolnih testov

V pogojih testnega sistema je bil virus stabilen ves čas testiranja, koncentracija infektivnih virusov se ni bistveno znižala.

Zaviralni učinek hladnega celičnega medija na delovanje testne snovi v visoki koncentraciji (testna snov, raztopljena v 4 ml medija) je bil potrjen. Titer virusa pred izpostavitvijo in po njej se ni bistveno razlikoval in ni presegel razlike $1 - \log_{10}(c)$ vrednosti koncentracije, ki jo standard določa kot mejno vrednost.

Nobena od testnih snovi v najvišji necitotoksični koncentraciji ni vplivala na dovzetnost celic za virus. Opazili smo le zelo majhna, a še sprejemljiva odstopanja.

Citotoksičnost testnih snovi v visoki koncentraciji smo testirali na razredčitvah od 10^{-1} do 10^{-11} . Citotoksičnost z deformacijo ali uničenjem celičnega sloja se je pri testnih snoveh CPK, kombinaciji BK in CPK kot prostih učinkovin, pri pastilah z BK in CPK z okusom po evkaliptu in pri pastilah s placebom ter okusom po evkaliptu pokazala pri razredčitvah 10^{-1} in 10^{-2} . Pri pastilah z BK in CPK z okusom po limoni in medu ter pastilah s placebom in z okusom po limoni in

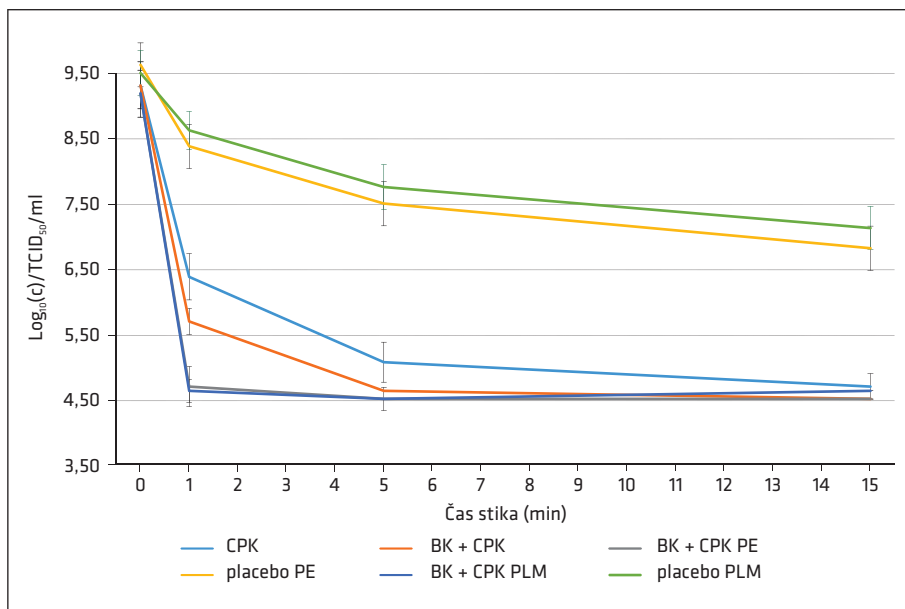
medu pa smo citotoksičnost zaznali le pri razredčitvi 10^{-1} . S tem smo določili mejo, pri kateri je smiselno odčitavanje citopatskega učinka virusa. Raven citotoksičnosti glede na razredčitev virusa v testni suspenziji je prikazana v tabeli 4.

Rezultati učinkovanja testnih snovi na inaktivacijo virusa

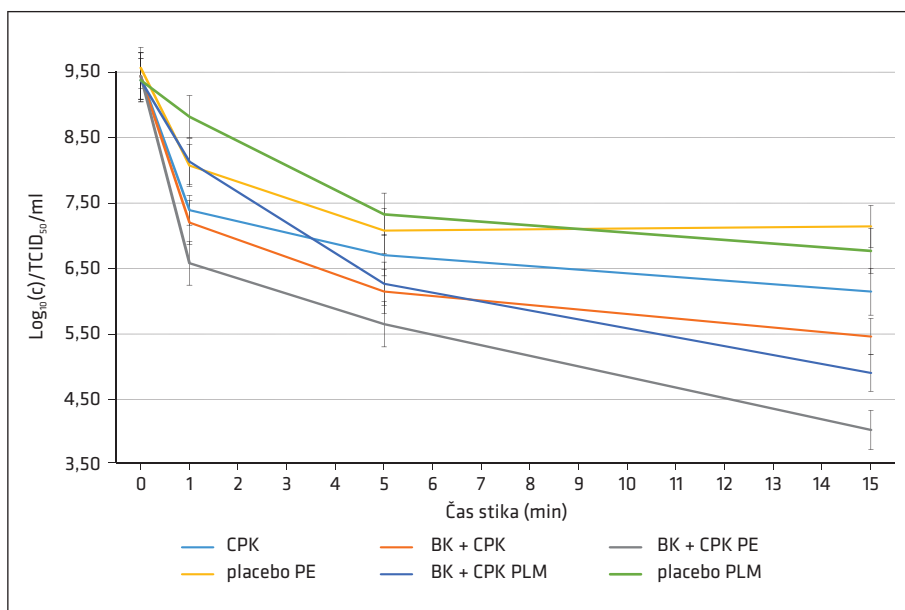
Vsako testno koncentracijo smo testirali dvakrat, na različna dneva. Končni rezultat je prikazan kot povprečje obeh testiranj. Številski prikaz rezultatov je v tabelah 3 in 4, grafični prikaz pa na slikah 1, 2 in 3.

Virucidnost je bila močno izražena v najvišji koncentraciji, ki je ekvivalent raztapljanja ene pastile v 4 ml suspenzije. V srednji koncentraciji, ki je ekvivalent raztapljanja ene pastile v 20 ml suspenzije, je bila virucidnost še vedno izražena, toda s spremenjeno dinamiko, saj so se podobni učinki pokazali šele po 15 minutah.

Rezultati kažejo na izrazito razliko med virucidnostjo pastil z učinkovinami in pastilami s placebom. Najbolj opazna je pri visoki in srednji koncentraciji, vidna pa je tudi pri nizki koncentraciji.



Slika 1. Izpostavitve virusa influence A testni snovi v najvišji koncentraciji (ekvivalent raztopine ene pastile v 4 ml suspenzije) v treh različnih časih stika. $TCID_{50}/ml$ – 50-% kužni odmerek za tkivno kulturo (angl. *median tissue culture infectious dose*), CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, PE – pastila, evkalipt, PLM – pastila, limona, med.



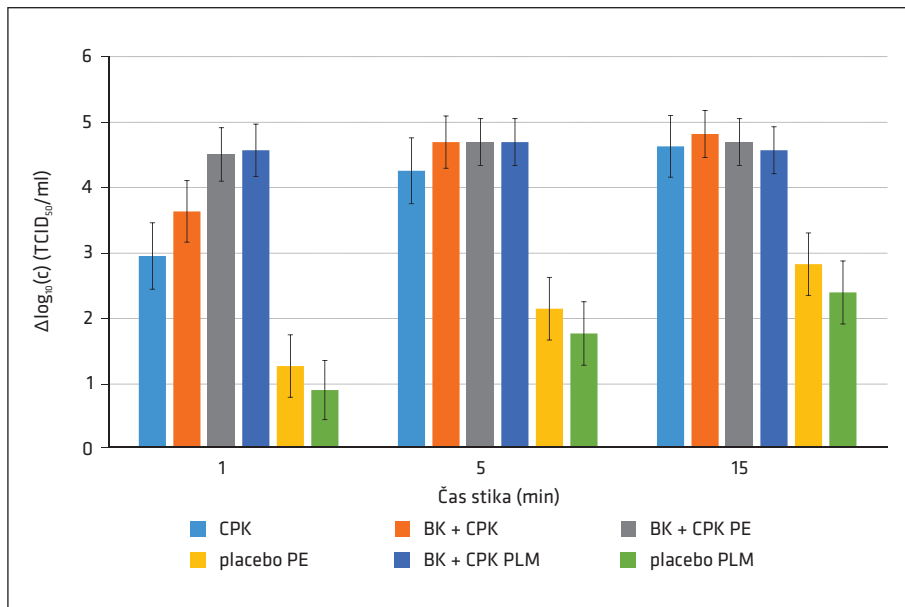
Slika 2. Izpostavitve virusa influence A testni snovi v srednji koncentraciji (ekvivalent raztopine ene pastile v 20 ml suspenzije) v treh različnih časih stika. $TCID_{50}/ml$ – 50-% kužni odmerek za tkivno kulturo (angl. *median tissue culture infectious dose*), CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, PE – pastila, evkalipt, PLM – pastila, limona, med.

Tabela 3. Testne učinkovine z vrednostjo pH in znižanjem koncentracije infektivnih delcev virusa influence A glede na koncentracijo in čas stika. CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, IZ – interval zaupanja.

| | CPK kot prosta učinkovina | BK in CPK kot prosti učinkovini | Pastila z BK in CPK, evkalipt | Pastila s placebo, evkalipt | Pastila z BK in CPK, limona, med | Pastila s placebo, limona, med |
|--|---|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Visoka koncentracija (raztopljeno v 4 ml suspenzije) | | | | | | |
| Vrednost pH | 7,86 | 8,06 | 3,27 | 3,14 | 2,73 | 2,69 |
| Čas (min) | $\Delta \log_{10}(c) \pm 95\% \text{ IZ}$ | | | | | |
| 1 | $-2,94 \pm 0,51$ | $-3,63 \pm 0,47$ | $-4,50 \pm 0,41$ | $-1,25 \pm 0,48$ | $-4,57 \pm 0,40$ | $-0,88 \pm 0,45$ |
| 5 | $-4,25 \pm 0,47$ | $-4,69 \pm 0,40$ | $-4,69 \pm 0,36$ | $-2,13 \pm 0,48$ | $-4,69 \pm 0,36$ | $-1,75 \pm 0,49$ |
| 15 | $-4,63 \pm 0,41$ | $-4,82 \pm 0,36$ | $-4,69 \pm 0,36$ | $-2,82 \pm 0,48$ | $-4,57 \pm 0,36$ | $-2,38 \pm 0,48$ |
| Srednja koncentracija (raztopljeno v 20 ml suspenzije) | | | | | | |
| Vrednost pH | 7,92 | 7,93 | 4,45 | 4,61 | 3,72 | 3,55 |
| Čas (min) | $\Delta \log_{10}(c) \pm 95\% \text{ IZ}$ | | | | | |
| 1 | $-2,06 \pm 0,42$ | $-1,63 \pm 0,49$ | $-2,88 \pm 0,49$ | $-1,50 \pm 0,45$ | $-1,25 \pm 0,48$ | $-0,56 \pm 0,47$ |
| 5 | $-2,75 \pm 0,48$ | $-3,19 \pm 0,50$ | $-3,81 \pm 0,49$ | $-2,50 \pm 0,47$ | $-3,13 \pm 0,47$ | $-2,06 \pm 0,47$ |
| 15 | $-3,31 \pm 0,51$ | $-3,75 \pm 0,47$ | $-5,44 \pm 0,45$ | $-2,44 \pm 0,45$ | $-4,50 \pm 0,44$ | $-2,62 \pm 0,48$ |
| Nizka koncentracija (raztopljeno v 30 ml suspenzije) | | | | | | |
| Vrednost pH | 7,85 | 7,97 | 5,33 | 5,21 | 4,00 | 4,04 |
| Čas (min) | $\Delta \log_{10}(c) \pm 95\% \text{ IZ}$ | | | | | |
| 1 | $-0,62 \pm 0,34$ | $-1,19 \pm 0,47$ | $-1,50 \pm 0,44$ | $-1,00 \pm 0,45$ | $-1,26 \pm 0,47$ | $-0,75 \pm 0,45$ |
| 5 | $-1,87 \pm 0,32$ | $-1,63 \pm 0,44$ | $-2,25 \pm 0,47$ | $-1,32 \pm 0,47$ | $-2,00 \pm 0,47$ | $-1,19 \pm 0,47$ |
| 15 | $-2,62 \pm 0,34$ | $-3,38 \pm 0,47$ | $-3,32 \pm 0,41$ | $-1,94 \pm 0,47$ | $-3,00 \pm 0,43$ | $-2,13 \pm 0,40$ |

Tabela 4. Rezultati testiranja virucidnosti na virus influence A. CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, IZ – interval zaupanja.

| Čas (min) | CPK (0,25 mg/ml) | | | | BK in CPK (0,25 in 0,75 mg/ml) | | | | Pastile s placebom, evkalipt (1 pastila/4 ml) | | | | Pastile z BK in CPK, limona, med (1 pastila/4 ml) | | | | Pastile s placebom, limona, med (1 pastila/4 ml) | | | | Kontrola z virusom | | | | |
|----------------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|----------------------------------|---------|-----------------------|---------|--|---------|-----------------------|---------|--|---------|-----------------------|---------|--|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|--|
| | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | |
| 0 | 9,32 | 0,72 | 9,32 | 0,72 | 9,19 | 0,72 | 9,19 | 0,72 | 9,63 | 0,68 | 9,19 | 0,72 | 9,19 | 0,72 | 9,51 | 0,70 | 9,41 | 0,67 | | | | | | | |
| 1 | 6,38 | 0,71 | 5,69 | 0,61 | 4,69 | 0,40 | 8,38 | 0,68 | 4,63 | 0,35 | 4,63 | 0,35 | 8,63 | 0,58 | | | | | | | | | | | |
| 5 | 5,07 | 0,62 | 4,63 | 0,35 | 4,50 | 0,00 | 7,50 | 0,69 | 4,50 | 0,00 | 4,50 | 0,00 | 7,76 | 0,68 | | | | | | | | | | | |
| 15 | 4,69 | 0,40 | 4,50 | 0,00 | 4,50 | 0,00 | 6,82 | 0,68 | 4,63 | 0,00 | 4,63 | 0,00 | 7,13 | 0,67 | | | | | | | | | | | |
| Citotoksičnost | 4,50 | / | 4,50 | / | 4,50 | / | 4,50 | / | 4,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | | | | | | | |
| Čas (min) | CPK (0,05 mg/ml) | | | | BK in CPK (0,05 in 0,15 mg/ml) | | | | Pastile s placebom, evkalipt (1 pastila/20 ml) | | | | Pastile z BK in CPK, limona, med (1 pastila/20 ml) | | | | Kontrola z virusom | | | | | | | | |
| | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | |
| 0 | 9,44 | 0,71 | 9,44 | 0,71 | 9,44 | 0,71 | 9,57 | 0,63 | 9,38 | 0,67 | 9,38 | 0,67 | 9,38 | 0,67 | 9,38 | 0,67 | 9,41 | 0,67 | | | | | | | |
| 1 | 7,38 | 0,46 | 7,82 | 0,67 | 6,57 | 0,67 | 8,07 | 0,65 | 8,13 | 0,70 | 8,82 | 0,65 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 6,69 | 0,64 | 6,26 | 0,70 | 5,63 | 0,68 | 7,07 | 0,69 | 6,25 | 0,67 | 7,32 | 0,66 | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 6,13 | 0,72 | 5,69 | 0,60 | 4,01 | 0,56 | 7,13 | 0,65 | 4,88 | 0,56 | 6,76 | 0,69 | 9,36 | 0,62 | | | | | | | | | | | |
| Citotoksičnost | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | 3,50 | / | | | | | | | |
| Čas (min) | CPK (0,033 mg/ml) | | | | BK in CPK (0,033 in 0,099 mg/ml) | | | | Pastile s placebom, evkalipt (1 pastila/30 ml) | | | | Pastile z BK in CPK, limona, med (1 pastila/30 ml) | | | | Kontrola z virusom | | | | | | | | |
| | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | log ₁₀ (c) | 95-% IZ | |
| 0 | 9,25 | 0,51 | 9,63 | 0,65 | 9,63 | 0,65 | 9,63 | 0,65 | 9,63 | 0,65 | 9,63 | 0,65 | 9,63 | 0,65 | 9,63 | 0,65 | 9,41 | 0,67 | | | | | | | |
| 1 | 8,63 | 0,44 | 8,44 | 0,68 | 8,13 | 0,59 | 8,63 | 0,63 | 8,38 | 0,68 | 8,88 | 0,63 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 7,38 | 0,38 | 8,00 | 0,60 | 7,38 | 0,68 | 8,32 | 0,69 | 7,63 | 0,67 | 8,44 | 0,67 | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 6,63 | 0,46 | 6,26 | 0,68 | 6,32 | 0,50 | 7,69 | 0,68 | 6,63 | 0,57 | 7,50 | 0,48 | 9,36 | 0,62 | | | | | | | | | | | |
| Citotoksičnost | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | | | | | | | |



Slika 3. Primerjava znižanja količine infektivnih virusov pri najvišji koncentraciji (ekvivalent raztopine ene pastile v 4 ml suspenzije) v treh različnih časih stika. $TCID_{50}/ml$ – 50-% kužni odmerek za tkivno kulturo (angl. median tissue culture infectious dose), CPK – cetilpiridinijev klorid, BK – benzidaminijev klorid, PE – pastila, evkalipt, PLM – pastila, limona, med.

RAZPRAVA

Virucidno delovanje CPK proti virusu influence so preučevale in potrdile že nekatere predhodne raziskave (7). V nedavnem testiranju *in vitro* je bila dokazana virucidna učinkovitost pastil s kombinacijo BK in CPK proti SARS-CoV-2. Koncentracija virusa v suspenziji z najvišjo koncentracijo se je že po eni minuti znižala za $4 \log_{10}(c)$ (6).

Ta raziskava je, kot je bilo pričakovano, pokazala podobne trende virucidnosti pastile s kombinacijo BK in CPK na virus influence A, saj sta bila v obeh testiranjih *in vitro* uporabljena virusa z ovojnico, na katero naj bi neposredno učinkoval CPK (6, 7).

Testiranje je potekalo po enakem protokolu in pod enakimi pogoji, kot so bili uporabljeni pri testiranju z virusom SARS-CoV-2. Pomembno razliko je predstavljal le tripsin v vzdrževalnem mediju, saj ga je bilo treba dodati zaradi zagotavljanja infektivnosti virusov influence. Zaradi izjemno

nizke koncentracije tripsina v gojišču njegovega vpliva na testne snovi nismo preverjali, saj je bila prvotna inkubacija virusa z učinkovino brez tega dodatka. Dodan je bil le mediju, v katerem smo pripravljali razredčitve testne snovi z virusom pred nanosom na celične kulture.

Največji virucidni učinek vseh testnih snovi se je po pričakovanih pokazal pri suspenzijah z visoko koncentracijo, pri katerih smo dokazali, da se koncentracija infektivnih virusov že po petih minutah zniža za več kot $4 \log_{10}(c)$ (10.000-kratno oz. 99,99-% znižanje). Pastile s kombinacijo BK in CPK (z okusom po evkaliptu in z okusom po limoni in medu) so znižanje za $4 \log_{10}(c)$ dosegle že po eni minuti (sliki 1 in 3). Ob upoštevanju vseh kontrolnih postopkov rezultati nakazujejo veliko virucidno učinkovitost testnih snovi z učinkovinami. Virucidni učinek pastil s placebo (z okusom po evkaliptu in z okusom po limoni in

medu) značilno odstopa od učinka pastil s kombinacijo BK in CPK, kar je razvidno na sliki 1 in sliki 3 ter v tabeli 4. Pastili s kombinacijo BK in CPK sta dosegli ustrezno znižanje koncentracije infektivnih virusov za $4 \log_{10}(c)$ tudi v suspenzijah s srednjo koncentracijo, ki se je ob upoštevanju vseh parametrov dinamike raztapljanja pastile in izločanju slin (približno 4,0 do 5,0 ml/min med stimulativnimi aktivnostmi, npr. pri lizanju pastile) najbolj približala domnevni koncentraciji, ki bi bila lahko dosežena ob dejanski uporabi pastile, če je za raztopitev pastile potrebnih 5–10 minut (10). Tudi CPK ter kombinacija BK in CPK kot prostih učinkovin sta se približali meji zmanjšanja za $4 \log_{10}(c)$.

Podobno kot pri predhodnem testiranju s SARS-CoV-2 *in vitro* tudi pri testiranju seva virusa influence testne snovi v nizki koncentraciji niti po 15 minutah niso dosegle znižanja za $4 \log_{10}(c)$ (6).

Jasen trend zmanjševanja količine virusa je bil opažen med celotnim 15-minutnim časa stika pri suspenzijah testnih snovi v vseh koncentracijah (razen pri pastilah s placebom).

Tako pastile s kombinacijo BK in CPK kot BK in CPK kot prosti učinkovini so kazali jasno dinamiko virucidnega delovanja – najhitrejši učinki so se kazali pri najvišji koncentraciji, hitrost delovanja pa se je manjšala z nižanjem koncentracije. Krivulja padanja koncentracije virusov je bila s časom položnejša pri srednji, še bolj pa pri najnižji koncentraciji (slika 1 in slika 2). Ta dinamika ni bila opazna pri pastilah s placebom (z obema okusoma), pri katerih je bil po 15 minutah konstantni učinek znižanja koncentracije infektivnih virusov med 1,94 in $2,82 \log_{10}(c)$. Kot so pri testiranjih z virusom SARS-CoV-2 *in vitro* že ugotovili, je dejavnik inaktivacije virusov verjetno tudi nizka vrednost pH, ki je podobna kot pri pastilah s kombinacijo BK in CPK (6).

Ena od pomembnejših lastnosti, ki bi jih moral imeti peroralni antiseptik, je obstoj-

nost na mestu nanosa. Vemo, da je obstojnost CPK velika (od tri do pet ur), kar lahko omogoči večjo in daljšo učinkovitost proti virusu (1). Poleg tega lahko k učinkovitosti prispeva tudi farmacevtska oblika. Med farmacevtske oblike za lokalno lajšanje vnetja žrela spadajo tekočine za izpiranje ust (grgranje), pršila in pastile. Pokazalo se je, da pride pri pastilah do večjega začetnega odlaganja učinkovine v ustih in žrelu ter do počasnejšega izpiranja iz ustne votline kot pri pršilih in tekočinah za izpiranje ust (grgranje). To nakazuje, da je učinek pastil lahko trajnejši (11).

Rezultati testiranj temeljijo na nadzorovanih laboratorijskih pogojih, s katerimi smo se skušali približati fiziološkim pogojem v ustni votlini.

Rezultatov testiranja *in vitro* zaradi številnih dejavnikov ni mogoče preslikati v *in vivo* pogoje tudi, če upoštevamo fizikalno-kemijske pogoje, ki smo se jim skušali približati. Raziskava je dokazala le, da CPK, kombinacije BK in CPK kot prostih učinkovin in kombinacije BK in CPK v pastili delujejo virucidno in bi podobno verjetno delovale tudi na sluznici ust in žrela. V vsakem primeru pa bi bil virucidni učinek omejen le na proste infektivne viruse na sluznici ali v slini, ki bi bili neposredno izpostavljeni učinkovini. Podatki iz literature nakazujejo, da je koncentracija virusnih delcev v slini v območju od 4 do $6 \log_{10}(c)$ virusnih genomskih kopij na mililiter (12). Pri testiranju smo uporabili bistveno višjo koncentracijo virusov ($8-10 \log_{10}(c)$ infektivnih virusnih delcev na mililiter). Nadaljnje raziskave bi bile smiselne v okviru kliničnih testiranj. Če bi rezultati kazali na podobno učinkovitost, bi lahko uporaba pastil s kombinacijo BK in CPK močno vplivala na zmanjšanje verjetnosti kapljičnega prenosa.

Z raziskavo *in vitro* smo potrdili virucidno delovanje CPK ter kombinacije BK in CPK v obliki proste (čiste) učinkovine in v obliki pastil na virus influence A.

Najvišjo učinkovitost, ki se je pomembno razlikovala od učinkovitosti pastil s placebom, smo dokazali za pastile s kom-

binacijo BK in CPK; primerljiva je bila pri pastili z okusom po evkaliptu in pastili z okusom po limoni in medu.

LITERATURA

1. Mateos-Moreno MV, Mira A, Ausina-Márquez V, Ferrer MD. Oral antiseptics against coronavirus: In-vitro and clinical evidence. *J Hosp Infect.* 2021; 113: 30–43.
2. Ming-Hsu C, Po-Chun C. The effectiveness of mouthwash against SARS-CoV-2 infection: A review of scientific and clinical evidence. *J Formos Med Assoc.* 2021; S0929-6646(21)00469-1.
3. Seneviratne CJ, Balan P, Ko KKK, et al. Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: Randomized control trial in Singapore. *Infection.* 2021; 49: 305–11.
4. Morokutti-Kurz M, Graf C, Prieschl-Grassauer E. Amylmetacresol/2,4-dichlorobenzyl alcohol, hexylresorcinol, or carrageenan lozenges as active treatments for sore throat. *Int J Gen Med.* 2017; 10: 53–60.
5. Košir P. Primerjalna raziskava terapevtske enakovrednosti med testnim in referenčnim zdravilom fiksne kombinacije 3 miligramov benzidaminijevega klorida in 1 miligrama cetilpiridiniijevega klorida pri preiskovancih z vnetim žrelom, povezanim z okužbami zgornjih dihal. *Med Razgl.* 2015; 54 (3): 433–42.
6. Steyer A, Marušič M, Kolenc M, et al. A throat lozenge with fixed combination of cetylpyridinium chloride and benzydamine hydrochloride has direct virucidal effect on SARS-CoV-2. *COVID.* 2021; 1 (2): 435–46.
7. Popkin DL., Zilka S, Dimaano M, et al. Cetylpyridinium chloride (CPC) exhibits potent, rapid activity against influenza viruses in vitro and in vivo. *Pathog Immun.* 2017; 2 (2): 252–69.
8. SIST EN 14476:2013+A2:2019 [internet]. Ljubljana: Slovenski inštitut za standardizacijo; c2009 [citirano 2021 Dec 10]. Dosegljivo na: <http://ecommerce.sist.si/catalog/project.aspx>
9. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.* 1931; 162: 480–7.
10. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *J Med. Life.* 2009; 2 (3): 303–7.
11. Farrer F. Sprays and lozenges for sore throats. *S Afr Pharm J.* 2011; 78 (4): 26–31.
12. Kw To K, Lu L, Cy Yip C, et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6 (6): e49.