

## Eficacia viricida de diferentes enjuagues bucales contra el SARS-CoV-2

Toni Luise Meister,<sup>1</sup> Yannick Brüggemann,<sup>1</sup> Daniel Todt,<sup>1,2</sup> Carina Conzelmann,<sup>3</sup> Janis A. Müller,<sup>3</sup> Rüdiger Groß,<sup>3</sup> Jan Münch,<sup>3</sup> Adalbert Krawczyk,<sup>4,5</sup> Jörg Steinmann,<sup>6,7</sup> Jochen Steinmann,<sup>8</sup> Stephanie Pfaender,<sup>1,a</sup> and Eike Steinmann<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup>Department for Molecular and Medical Virology, Ruhr University Bochum, Bochum, Germany, <sup>2</sup>European Virus Bioinformatics Center, Jena, Germany, <sup>3</sup>Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany, <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, West German Centre of Infectious Diseases, Universitätsmedizin Essen, University Duisburg-Essen, Essen, Germany, <sup>5</sup>Institute for Virology, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, <sup>6</sup>Institute of Clinical Hygiene, Medical Microbiology and Infectiology, General Hospital Nürnberg, Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany, <sup>7</sup>Institute of Medical Microbiology, University Hospital of Essen, Essen, Germany, and <sup>8</sup>Dr. Brill + Partner GmbH Institute for Hygiene and Microbiology, Bremen, Germany.

*The Journal of Infectious Diseases*, Oxford University Press para IDSA, DOI:10.1093/infdis/jiaa471, 15 de octubre, 2020.

La pandemia en curso del SARS-CoV-2 crea una amenaza significativa para salud. Estudios recientes sugirieron la importancia de la garganta y las glándulas salivales como sitios principales de replicación y transmisión del virus durante la enfermedad temprana del coronavirus 2019, promoviendo así la aplicación de antisépticos orales. Sin embargo, la eficacia antiviral de las soluciones de enjuague bucal contra el SARS-CoV-2 no ha sido examinada. Aquí, evaluamos la actividad viricida de diferentes enjuagues bucales disponibles contra el SARS-CoV-2 en condiciones que simulan las secreciones nasofaríngeas. Varias formulaciones con importantes propiedades de inactivación del SARS-CoV-2 in vitro apoyan la idea de que el enjuague oral podría reducir la carga viral de la saliva y, por lo tanto, podría reducir la transmisión del SARS-CoV-2.

**Palabras clave.** SARS-CoV-2; enjuagues bucales; inactivación; suspensión prueba; transmisión.

El SARS-CoV-2 ha creado una amenaza significativa para la salud global. Dado que no hay disponibles tratamientos y vacunas eficaces, la atención diligente en las precauciones basadas en la transmisión, son esenciales para limitar la propagación viral. Según la evidencia actual, el SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de las gotitas exhaladas de individuos infectados [1]. Las cargas virales son altas en la cavidad nasal, nasofaringe y orofaringe, y la diseminación viral se puede detectar antes, durante y después de la fase clínica aguda de la enfermedad [2]. Los aerosoles producidos por los individuos asintomáticos durante la respiración, el habla y por lo tanto, el canto, se consideran impulsores críticos de la propagación del SARS-CoV-2 [3]. La envoltura del SARS-CoV-2, derivada de la célula huésped, es muy susceptible a los agentes químicos (es decir, varios alcoholes) que alteran las membranas lipídicas biológicas [4]. La antisepsia química, por lo tanto, proporciona una herramienta crítica para descontaminar los fómites y superficies (corporales), como manos humanas. En este contexto, se ha sugerido que la antisepsia nasal y oral, puede reducir el número de partículas víricas activas en aerosol de los conductos nasales y cavidad oral y, en consecuencia, reducir el riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 [5]. Los enjuagues bucales antisépticos con actividad antimicrobiana se utilizan en diversas situaciones clínicas con fines profilácticos y propósitos terapéuticos, y se han aplicado en el contexto de infecciones virales [5]. Aunque varios enjuagues bucales dentales disponibles comercialmente contienen agentes

que dañan la membrana (es decir, etanol, clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, peróxido de hidrógeno y povidona yodada), su capacidad para inactivar el SARS-CoV-2 en condiciones biológicamente relevantes no ha sido evaluado sistemáticamente [5]. Aquí, probamos la actividad viricida de 8 enjuagues bucales disponibles comercialmente que contienen diferentes compuestos activos contra 3 diferentes cepas SARS-CoV-2 aislados, en condiciones que imitan las secreciones nasofaríngeas.

## MÉTODOS

---

### Propagación y cepas de virus

Para aislar el SARS-CoV-2 en el Centro Médico de la Universidad de Ulm (Ulm, Alemania), se sembraron 50000 células Vero E6 en 24 placas-pocillos en 500  $\mu$ L de medio, incubados durante la noche a 37 ° C. El siguiente día, el medio fue reemplazado por 400  $\mu$ L de anfotericina B, 2.5  $\mu$ g / mL. Luego, 100  $\mu$ L de hisopado de garganta, con PCR cuantitativa positiva para SARS-CoV-2, se titularon 5 veces en las células, y fueron incubados durante 3-5 días. Tras el efecto la visualización del efecto citopático, el sobrenadante se tomó y el virus se expandió mediante la inoculación de Células Vero E6 en matraces de 75 cm<sup>2</sup> y se propagaron como se describió anteriormente. De este modo, se consiguieron los aislamientos virales BetaCoV/ Alemania/ Ulm/ 01/ 2020 (cepa 2) y BetaCoV/ Alemania/ Ulm/ 02/ 2020 (cepa 3). En Essen, Alemania, se aisló el SARS-CoV-2 de un hisopado nasofaríngeo de un paciente que padecía COVID-19, se obtuvo la denominada cepa UKEssen (cepa 1). El hisopado se tomó utilizando un vial de Virocult (Sigma, Alemania). El medio Virocult se incubó luego en células Vero E6 cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco, que contenía un 10% (v / v) suero de ternero fetal y suplementado con penicilina (100 UI/ mL), estreptomina (100  $\mu$ g/ mL), ciprofloxacina (10  $\mu$ g / mL), y anfotericina B (2,5  $\mu$ g / ml). Cinco días después de la infección, se recogió el sobrenadante y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Posteriormente, se utilizaron 100  $\mu$ L del sobrenadante transparente para la infección posterior de células Vero E6 frescas. Después de 5 días de incubación, la suspensión del virus se recogió y se aclaró a partir de restos celulares por centrifugación y se almacenó a -80 ° C. Los títulos virales de las 3 cepas se determinaron mediante ensayo de dilución de punto final y se calculó la dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50% (DICT50 / mL).

### Prueba de suspensión cuantitativa y valoración del virus

La actividad viricida se determinó con una prueba de suspensión cuantitativa, con un tiempo de exposición de 30 segundos. En resumen, 1 parte de la suspensión de virus se mezcló con 1 parte de la carga orgánica, imitando las secreciones respiratorias (100  $\mu$ L de mucina tipo I-S, 25  $\mu$ L de fracción V de BSA y 35  $\mu$ L de extracto de levadura, todos Sigma-Aldrich) y 8 partes del enjuague bucal [6]. El medio sirvió como control.

Después de 30 segundos de tiempo de exposición, se detuvo la actividad por dilución en serie. Se determinaron los valores de TCID50 / mL por tinción con violeta cristal y posterior puntuación de las cantidades de pozos que presentan efectos citopáticos. La TCID50 se calculó mediante el algoritmo de Spearman-Kärber. La reducción del título, incluido su intervalo de confianza del 95% como la diferencia entre el título del virus después del contacto con el enjuague bucal y el título de virus control con el medio (factor de reducción). Se controlaron

los efectos citotóxicos de los enjuagues bucales mediante tinción con violeta cristal, utilizando células no infectadas y utilizadas para determinar el límite inferior de cuantificación (LLOQ).

Se realizó un análisis óptico, de la alteración de la densidad y de la morfología de la monocapa celular en ausencia de virus, y se cuantificó de forma análoga a la TCID<sub>50</sub>/ mL de la infectividad viral.

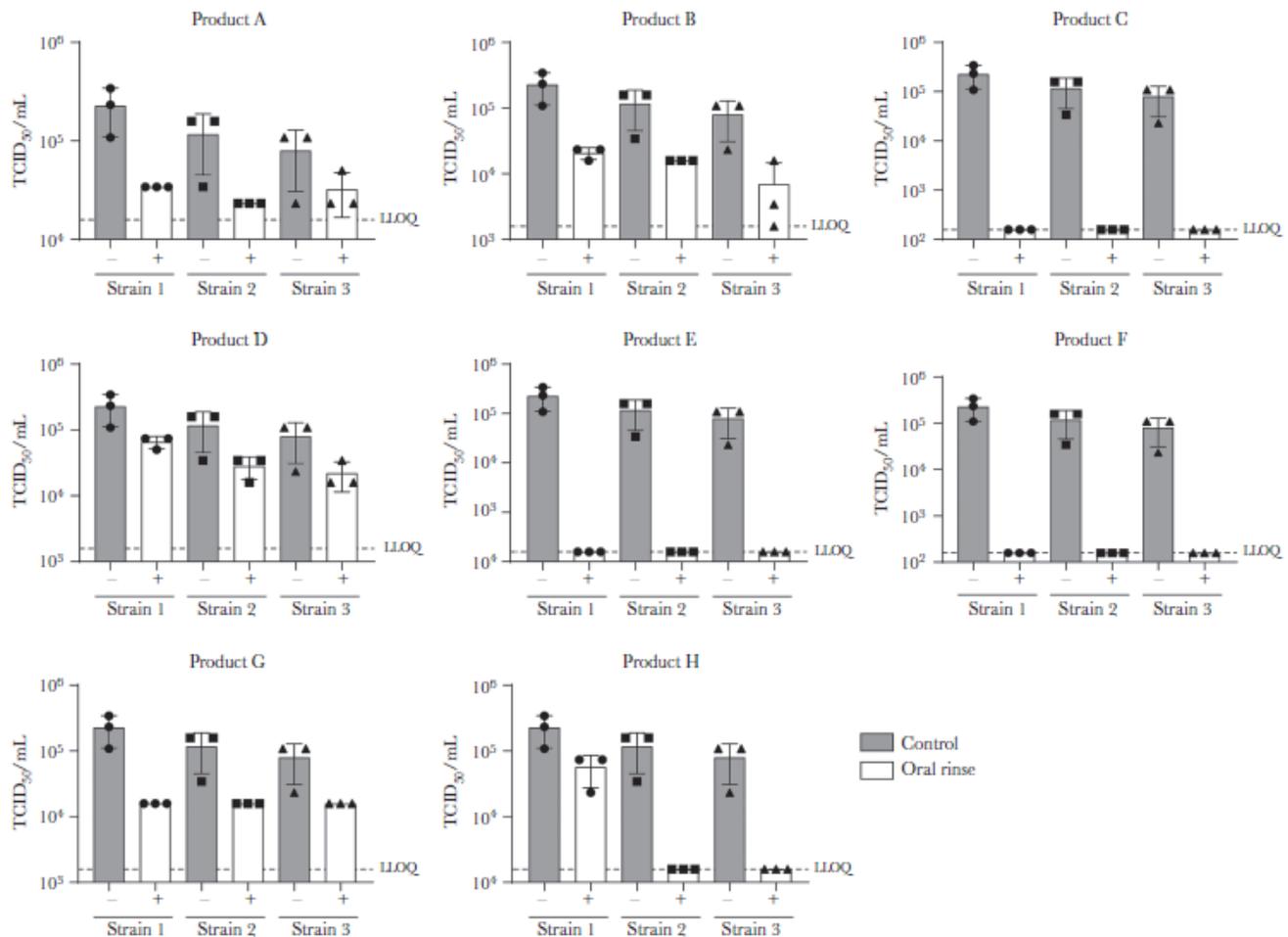
## RESULTADOS

Examinamos la actividad viricida de 8 enjuagues bucales disponibles comercialmente a base de diferentes principios activos (**Tabla 1**) utilizando una prueba de suspensión cuantitativa con 3 cepas diferentes de SARSCoV-2 aisladas, mezcladas con una sustancia interferente que imita una secreción respiratoria. Un control medio después de 30 segundos de exposición no redujo la infectividad viral, lo que implica que la sustancia interferente utilizada, que imita las secreciones nasales, no alteró la estabilidad del virus. Por el contrario, las diferentes cepas de SARSCoV-2 (cepas 1-3), fueron altamente susceptibles a varios enjuagues bucales. Tres de las 8 formulaciones, incluido los productos C, E y F, redujeron significativamente la infectividad viral hasta 3 órdenes de magnitud a los niveles de fondo (**Figura 1, Tabla 1**). Además, para los demás productos que contenían diferentes compuestos activos (**Tabla 1**), se pudieron observar actividades viricidas con factores de reducción logarítmica que oscilan entre 0,3 y 1,78 (**Figura 1, Tabla 1**). En el caso del producto H, que se basa en polihexametilen biguanida, la cepa 1 fue sólo moderadamente reducida, mientras que las otras 2 cepas se inactivaron para el LLOQ, que se determinó mediante el seguimiento de los efectos citotóxicos de los productos en las células no infectadas (**Figura 1**). En resumen, proporcionamos evidencia de que el SARS-CoV-2 puede ser inactivado eficientemente por enjuagues bucales disponibles comercialmente, en poco tiempo, con tiempos de exposición de 30 segundos.

**Table 1. Overview of Oral Rinses Used in the Study With Product Name, Active Compounds, and Calculated Reduction Factors**

| Product | Trade Name                  | Active Compound <sup>a</sup>                | Log Reduction Factor (Mean of n = 3) |          |          |
|---------|-----------------------------|---|--------------------------------------|----------|----------|
|         |                             |   | Strain 1                             | Strain 2 | Strain 3 |
| A       | Cavex Oral Pre Rinse        | Hydrogen peroxide                           | 0.78                                 | 0.61     | 0.33     |
| B       | Chlorhexamed Forte          | Chlorhexidinebis (D-gluconate)              | 1.00                                 | 0.78     | 1.17     |
| C       | Dequonal                    | Dequalinium chloride, benzalkonium chloride | ≥3.11                                | ≥2.78    | ≥2.61    |
| D       | Dynexidine Forte 0.2%       | Chlorhexidinebis (D-gluconate)              | 0.50                                 | 0.56     | 0.50     |
| E       | Iso-Betadine mouthwash 1.0% | Polyvidone-iodine                           | ≥3.11                                | ≥2.78    | ≥2.61    |
| F       | Listerine Cool Mint         | Ethanol, essential oils                     | ≥3.11                                | ≥2.78    | ≥2.61    |
| G       | Octenident mouthwash        | Octenidine dihydrochloride                  | 1.11                                 | 0.78     | 0.61     |
| H       | ProntOral mouthwash         | Polyaminopropyl biguanide (polyhexanide)    | 0.61                                 | ≥1.78    | ≥1.61    |

<sup>a</sup>The exact formulations for these oral rinses are not publicly available due to patent-related restrictions.



**Figure 1.** Virucidal activity of oral rinses against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). SARS-CoV-2 strains 1 (dot; UKEssen), 2 (square; BetaCoV/Germany/Ulm/01/2020), and 3 (triangle; BetaCoV/Germany/Ulm/02/2020) were incubated with medium (control) or various oral rinses for 30 seconds. Both conditions were supplemented with an interfering substance mimicking respiratory secretions. Viral titers were determined upon titration on Vero E6 cells. The cytotoxic effect was monitored using noninfected cells incubated with the different products, defined as the lower limit of quantification (LLOQ). The 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL) was calculated according to Spearman-Kärber. Data indicate averages and standard deviation of 3 independent experiments.

## DISCUSIÓN

Se sospecha la principal vía de transmisión del SARS-CoV-2 implica el contacto directo con aerosoles respiratorios o gotitas de personas infectadas, producidas durante los estornudos, al toser o hablar, y el contacto posterior con la nariz, la boca, o membranas mucosas oculares [1]. El SARS-CoV-2 coloniza inicialmente el tracto respiratorio superior de las personas infectadas [2]. Las altas cargas virales en la cavidad bucal proporcionan una rica fuente de virus potencialmente infecciosos, así como una ruta de entrada para nuevas infecciones. Por lo tanto, si se supone que la garganta funciona como un sitio importante de replicación viral durante las primeras etapas (incluso antes del inicio de los síntomas), la antisepsia oral podría reducir el número de partículas de virus infecciosas en aerosol, en consecuencia, el riesgo de transmisión o infección. Estudios de investigación experimental y clínica sobre virus relacionados con el SARS-CoV-2 (por ejemplo, los coronavirus SARS, MERS y el virus de la influenza H5N1) mostraron que las soluciones antisépticas que contienen gluconato de clorhexidina, polivinilpirrolidona, yodo, dióxido de cloro, cloruro de cetilpiridinio y peróxido de hidrógeno pueden reducir las cargas [7]. Descubrimos que diferentes cepas de SARS-CoV-2

pueden ser inactivados de manera eficiente con enjuagues bucales disponibles comercialmente, en condiciones biológicamente relevantes, que imitan las secreciones respiratorias. En particular, observamos que 3 formulaciones (productos C, E y F), que contienen diferentes compuestos activos, disminuyeron significativamente la infectividad viral a niveles indetectables.

De acuerdo con nuestra observación, los diferentes estudios que utilizan Listerine (producto F) observaron actividades antivirales específicamente contra virus envueltos, lo que implica un impacto en la envoltura lipídica viral [8-10]. Los efectos in vivo de las soluciones orales requieren más análisis durante los estudios clínicos. Los primeros ensayos con el objetivo de reducir la carga viral en pacientes con COVID-19 confirmado han sido registrados. Un estudio tiene como objetivo comparar 3 soluciones antisépticas de enjuague bucal / gárgaras en comparación con un control (agua destilada) para reducir la carga de SARS-CoV-2 en 120 personas con COVID-19 confirmado (<https://clinicaltrials.ucsf.edu/trial/NCT04409873>). Otro estudio ciego, controlado y aleatorizado, planea determinar el potencial de varios agentes para hacer gárgaras para reducir la carga viral intraoral entre los pacientes con COVID-19 confirmado por laboratorio (<https://Clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04341688>). Nuestros hallazgos abogan claramente por la evaluación de las formulaciones seleccionadas, en un contexto clínico, para evaluar sistemáticamente la descontaminación y la salud de los tejidos de la cavidad bucal, en pacientes y trabajadores sanitarios, para potencialmente prevenir la transmisión de virus.

## REFERENCIAS

---

1. Anfinrud P, Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A. Visualizing speech-generated oral fluid droplets with laser light scattering. *N Engl J Med* **2020**; 382:2061–3.
2. Wolfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **2020**; 581:465–9.
3. Meselson M. Droplets and aerosols in the transmission of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* **2020**; 382:2063.
4. Kratzel A, Todt D, V'kovski P, et al. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by WHO recommended hand rub formulations and alcohols. *Emerging Infect Dis* **2020**; 26:1592–5.
5. O'Donnell VB, Thomas D, Stanton R, et al. Potential role of oral rinses targeting the viral lipid envelope in SARS-CoV-2 infection. *Function* **2020**; 1:zqaa002.
6. Eggers M, Terletskaia-Ladwig E, Enders M. How effective is washing hands against influenza viruses? [in German]. *Hyg Med* **2009**; 34:492–8.
7. Eggers M, Koburger-Janssen T, Eickmann M, Zorn J. In vitro bactericidal and virucidal efficacy of povidone-iodine gargle/mouthwash against respiratory and oral tract pathogens. *Infect Dis Ther* **2018**; 7:249–59.
8. Dennison DK, Meredith GM, Shillitoe EJ, Caffesse RG. The antiviral spectrum of Listerine antiseptic. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **1995**; 79:442–8.

9. Meiller TF, Silva A, Ferreira SM, Jabra-Rizk MA, Kelley JI, DePaola LG. Efficacy of Listerine antiseptic in reducing viral contamination of saliva. *J Clin Periodontol* **2005**; 32:341–6.

10. Yamanaka A, Hirai K, Kato T, et al. Efficacy of Listerine antiseptic against MRSA, *Candida albicans* and HIV. *Bull Tokyo Dent Coll* **1994**; 35:23–6.