

Laboratory Medicine Clinic

Evaluation of saliva samples vs. nose/throat swabs for detection of respiratory viruses

Part of the validation of saliva as a specimen material in routine diagnostics of respiratory tract infections, St. Olav's Hospital

Erling Høyer and Andreas Christensen

1.1 Introduction

Saliva tests were launched in spring 2020 as specimen material for diagnosing SARS-CoV-2. (1). Several studies have demonstrated that sensitivity when using this material is good (2). It is also well suited to self-testing, which reduces the burden on the primary health care service and municipal health care service. This will be particularly beneficial in a pandemic situation, though also in a routine context. In this evaluation, we wished to examine the suitability of saliva for the detection of respiratory viruses other than SARS-CoV-2. In addition, we wished to examine whether the provision of a saliva sample early in the morning, before toothbrushing and the consumption of food and drink, would increase the sensitivity of the test.

1.2 Method

Saliva was collected in a device known as the SalivaPOD, which consists of a mouthpiece collected to a chamber (ConceptoMed, Ballstad, Norway). Patients themselves then transfer the saliva into a standard UTM tube via a closed connection. Nose/throat samples were taken using a standard swab test (eSwab, Copan Diagnostics). The swab was first brushed against the tonsils and velum before being inserted into the nose as far as the nasopharynx.

We used the QIAstat-Dx (QIAGEN) as the primary method of detection for 16 different viruses. This is a well-established multiplex platform for the detection of adenovirus, four endemic coronaviruses, SARS-CoV-2, metapneumovirus, influenza A virus, influenza B virus, four parainfluenza viruses, rhino-enteroviruses and RS virus (as well as *B. pertussis*, *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae*). Where a viral agent was found using the QIAstat-Dx, the sample was retested for the virus in question using in-house PCR. This was particularly important when rhinoviruses and/or enteroviruses were found. The QIAstat-Dx panel includes only a picornavirus-PCR, which does not distinguish between these closely related viruses.

Each participant provided at least two samples, hereinafter referred to as 'sample pairs': One nose/throat sample and one saliva sample. Some participants provided two sample pairs. The day on which the first sample pair was taken is hereinafter referred to as 'Day 1'. Sample pair number two was taken on the following morning in accordance with the instructions below. The day on which these samples were taken is hereinafter referred to as 'Day 2'. All samples were anonymized before processing and further analyses.

A statistical analysis of the categorical data was performed using a chi-square test and Fisher's exact test. We used the Wilcoxon rank sum test for paired data for assessing differences in Ct values between Day 1 and Day 2, as well as for comparing Ct values for nose/throat samples and saliva samples.

1.3 Scope

In the period November 2021–February 2023, we performed a prospective collection of samples from patients at the Leutenhaven testing station in Trondheim and employees of the Department of Medical Microbiology (DMM). All samples were from people with clear symptoms of respiratory tract infection. The participants provided a deep nose/throat sample and saliva sample at the same time. In addition, we asked them to take home equipment for performing a nose/throat test and saliva test so that they would be able to provide a new set of samples on the morning following the collection of the first sample. The morning samples were to be taken as soon as possible after awakening and before tooth brushing or consuming any food or drink. The patients delivered the samples to Trondheim municipality's testing stations or to the doctor in charge of validation at DMM. Ten (10) of the samples were taken by a doctor or other health care personnel at the testing stations. The remaining samples were taken by the participants, either from themselves or family members.

All the samplers were health care personnel (bioengineers or doctors).

All were instructed to insert the swab deep into the nose, all the way to the back. All participants were already familiar with the correct use of the SalivaPOD, as this kind of sampling equipment was in routine use in Trondheim during the pandemic.

1.4 Practical implementation

The saliva and swab samples were collected by the doctor in charge of validation. Most QIAstat-Dx testing was conducted by bioengineers at the Department's sample reception centre, and the remainder by the specialty registrar in charge of validation. In-house PCR testing was conducted by bioengineers at the Department's PCR laboratory. Samples that were positive using QIAstat-Dx were retested using in-house PCR. This was done so that our in-house respiratory virus PCRs, too, could be validated for use with saliva. If the in-house PCR did not confirm the findings from QIAstat-Dx, this was regarded as an indication of lower sensitivity of the in-house PCR. These results were therefore included as positive in the evaluation. For resource reasons, the in-house PCR panel was not used on all 274 samples.

We used qualitative PCRs, and the emphasis was therefore on qualitative agreement. Sensitivity, specificity and agreement (Cohen's kappa) were calculated. Ct values were used for relative quantitative analysis. Absolute quantitative analysis was not performed. No control was performed for symptom duration in this evaluation. We considered that this would have little effect on the comparison between the sample materials as the samples in each pair were taken simultaneously. Nevertheless, most of the patients were close to the peak of their symptoms around the time the samples were taken.

1.5 Criteria

In this evaluation, the goal was primarily to assess differences in sensitivity of PCR tests performed on saliva and nose/throat samples. There is no gold standard, and we therefore used the nose/throat sample as a reference. A sensitivity for saliva exceeding 80%, using the nose/throat sample as a reference, was considered to be acceptable. The requirement for agreement, as measured using Cohen's kappa, was set at greater than 0.6.

High specificity is expected when using a validated PCR methodology and standard control routines. In the absence of a gold standard, falsely low specificity figures may be seen for saliva as the sensitivity of the nose/throat test is lower than that for saliva. For these reasons, our only requirements regarding specificity were as follows: All internal controls and negative controls should 'go in', and positive results should be reproducible at Ct values ≥ 36 or in the case of deviating amplification

curves.

1.6 Results

We received 137 sample pairs from 93 patients and employees at DMM, consisting of one saliva sample and one nose/throat sample – a total of 274 samples. All 93 participants submitted the first sample pair, taken on Day 1. Forty-four (44) of these then submitted a further sample pair, taken on the morning of Day 2. The purpose of taking a test on the following morning was to see whether the lengthy period of fasting through the night affected the sensitivity of the tests. Twenty-five (25) per cent of the participants were children (aged 5–17 years) and 75 per cent were young adults (aged 25–50 years). Sixty (60) per cent were women.

Virus was detected in 190 of the 274 samples (118 out of 186 samples from Day 1 and 72 out of 88 samples from Day 2). The following viruses were detected: Influenza virus A, influenza virus B, parainfluenza virus 3, parainfluenza virus 4, rhinovirus, RS virus, SARS-CoV-2, coronavirus OC43, coronavirus NL63, coronavirus HKU1 and coronavirus 229E. Below we first show the results of all viruses combined. The results of the three most commonly detected viruses then follow.

1.6.1 All viruses combined, Day 1

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	54	4	58
	Neg	6	29	35
	Total	60	33	93

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	0.9	0.79	0.96
(Specificity)	0.88	0.71	0.96
Cohen's kappa	0.77	0.63	0.90

1.6.2 All viruses combined, Day 1 – combined gold standard

A positive result for any finding in the saliva and/or nose/throat sample was used as the gold standard – in other words, both concordant and discordant results for the virus in question. Findings of the same virus in the material in question were recorded. This allowed the sensitivity calculations for the two materials to be compared directly.

		Virus detected		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	58	0	58
	Neg	6	29	35

	Total	64	29	93
--	--------------	----	----	----

		Virus detected		
		Pos	Neg	Total
Nose/throat	Pos	60	0	60
	Neg	4	29	33
	Total	64	29	93

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity, saliva	0.91	0.80	0.96
Sensitivity, nose/throat	0.94	0.84	0.98

} Non-significant difference

	Saliva	Nose/throat	
Detection rates	58/93 (62.4%)	60/93 (64.5%)	Non-significant difference

1.6.3 All viruses combined, morning sample (Day 2)

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	35	2	37
	Neg	0	7	7
	Total	35	9	44

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	1	0.88	1
(Specificity)	0.78	0.40	0.96
Cohen's kappa	0.85	0.64	1

1.6.4 SARS-CoV-2, Day 1

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	
Saliva	Pos	18	2	20
	Neg	0	73	73
		18	75	93

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	1	0.78	1
Specificity	0.97	0.90	1

1.6.5 SARS-CoV-2, morning sample (Day 2)

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	10	0	10
	Neg	0	34	34
Total		10	34	44

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	1	0.66	1
Specificity	1	0.87	1

1.6.6 Influenza A, Day 1

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	11	1	12
	Neg	2	79	81
Total		13	80	93

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	0.85	0.54	0.97
Specificity	0.99	0.92	1

1.6.7 Influenza A, morning sample (Day 2)

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	11	1	12
	Neg	0	32	32
	Total	11	33	44

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	1	0.68	1
Specificity	0.97	0.82	1

1.6.8 Rhinovirus, Day 1

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	9	1	10
	Neg	3	80	83
	Total	12	81	93

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	0.75	0.43	0.93
Specificity	0.99	0.92	1

1.6.9 Rhinovirus, morning sample (Day 2)

		Nose/throat sample		
		Pos	Neg	Total
Saliva	Pos	4	0	4
	Neg	0	40	40
	Total	4	40	44

	Estimated value	95% conf. interval	
Sensitivity	1	0.40	1
Specificity	1	0.89	1

1.6.10 Ct values in samples from Day 1 and Day 2 (“morning sample”)

Samples from patients with a positive result on both days were included in these analyses. We compared Ct values sample pair by sample pair so that only Ct values for the same virus PCR were compared. It is true that different PCRs of somewhat differing efficacy will be included in the analysis, but the differences calculated in pairs will all apply to the same PCR.

1.6.10.1 Ct values in saliva samples taken on Day 1 compared with Ct values in saliva samples taken on Day 2, tested using the QIAstat-Dx.

- N=25
- Mean Ct value, Day 1: 30.0
- Mean Ct value, Day 2: 28.4
- Median Ct value, Day 1: 30.0 (95% CI 27.54 to 33.17)
- Median Ct value, Day 2: 29.4 (95% CI 25.04 to 32.04)
- p=0.004 (Wilcoxon)

1.6.10.2 Ct values in nose/throat samples taken on Day 1 compared with Ct values in nose/throat samples taken on Day 2, tested using the QIAstat-Dx

- N=32
- Mean Ct value, Day 1: 26.2
- Mean Ct value, Day 2: 25.5
- Median Ct value, Day 1: 27.4 (95% CI 23.50 to 29.50)
- Median Ct value, Day 2: 24.7 (95% CI 23.20 to 27.00)
- p=0.41 (Wilcoxon)

The results shown above indicate that saliva taken as a morning sample on Day 2 contains more virus than saliva taken during Day 1. Differences in Ct value may also be due to natural development of the course of the disease, although in that case we would also have expected a significant difference for nose/throat samples. This was not the case. We found corresponding results when we compared the Ct values for in-house PCR. In other words, the concentration of virus appeared to increase in saliva that had remained overnight in the salivary glands.

Hung et al. (2020) lends support to such a hypothesis (3). Moreover, in two studies using morning samples very high sensitivity figures were found for SARS-CoV-2 when using saliva as material (1, 4).

1.6.11 Ct values in saliva samples compared with Ct values in nose/throat samples

- N=26
- Nose/throat mean 26.1
- Saliva mean 30.7
- Median Ct value, nose/throat: 27.0 (95% CI 22.59 to 29.06)
- Median Ct value, saliva: 32.2 (95% CI 29.21 to 33.50)
- p=0.002 (Wilcoxon)

There were significantly lower Ct values in nose/throat samples than in saliva samples. This is as expected and shows that virus concentrations attained higher levels in the mucosa of the nose and throat than in saliva (5). As stated, there was a high degree of agreement when we compared qualitative results. This indicates that

PCR tests performed on both sample materials become positive within a period that is approximately equivalent, but that the viral concentration attains higher levels in the mucosa of the nose and throat during this period.

1.7 Practical suitability/User-friendliness

Good.

Saliva samples taken with the SalivaPOD are easy to process in the laboratory. Patients should receive guidance on how to perform sampling. Alternatively, it is recommended to review the instructional video at the following address: <https://salivapod.com/no/>.

1.8 Cost calculation

The SalivaPOD is more expensive than swabs; on the other hand, there will be savings on resources used for taking and handling samples in doctors' surgeries. No more detailed calculation has been performed.

1.9 Conclusion

There was very good qualitative agreement between saliva samples and nose/throat samples. This has also been shown in previous studies for a number of different respiratory viruses (2, 5–8). Saliva samples taken in the morning, before toothbrushing or consuming any food or drink, provided the best results and this is recommended as the first option.

Saliva and nose/throat swabs are thus considered equivalent materials for detecting respiratory viruses. Saliva samples can be used in the routine diagnostics of viral respiratory tract infections in primary health care.

The use of saliva samples will also be of benefit in a preparedness context. This would simplify the upscaling to mass testing of saliva samples in the event of future pandemics.

The following respiratory viruses were not detected in this study: Adenovirus, metapneumovirus, human bocavirus and parainfluenza viruses 1 and 2. Experiments will be conducted using simulated saliva samples to which these viruses have been added.

1.10 References

1. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(13):1283-6.
2. Duncan DB, Mackett K, Ali MU, Yamamura D, Balion C. Performance of saliva compared with nasopharyngeal swab for diagnosis of COVID-19 by NAAT in cross-sectional studies: Systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem*. 2023;117:84-93.
3. Hung DL, Li X, Chiu KH, Yip CC, To KK, Chan JF, et al. Early-Morning vs Spot Posterior Oropharyngeal Saliva for Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection: Implication of Timing of Specimen Collection for Community-Wide Screening. *Open Forum Infect Dis*. 2020;7(6):ofaa210.
4. Rao M, Rashid FA, Sabri FSAH, Jamil NN, Zain R, Hashim R, et al. Comparing Nasopharyngeal Swab and Early Morning Saliva for the Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical Infectious*

Diseases. 2020;72(9):e352-e6.

5. 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. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(3):372-8.
6. Kim YG, Yun SG, Kim MY, Park K, Cho CH, Yoon SY, et al. Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2017;55(1):226-33.
7. Kiryanov SA, Levina TA, Kadochnikova VV, Konopleva MV, Suslov AP, Trofimov DY. Clinical Evaluation of Nasopharyngeal, Oropharyngeal, Nasal Swabs, and Saliva for the Detection of SARS-CoV-2 by Direct RT-PCR. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(5).
8. Miguères M, Mansuy JM, Vasseur S, Claverie N, Lougarre C, Soulier F, et al. Omicron Wave SARS-CoV-2 Diagnosis: Evaluation of Saliva, Anterior Nasal, and Nasopharyngeal Swab Samples. *Microbiol Spectr*. 2022;10(6):e0252122.

Evaluering av spyttprøver vs. hals-/neseprøve for påvisning av luftveisvirus

Ledd i validering av spytt som prøvemateriale til rutinediagnostikk av luftveisinfeksjoner, St. Olavs hospital

Erling Høyer og Andreas Christensen

1.1 Innledning

Spyttprøver ble våren 2020 lansert som prøvemateriale til påvisning av SARS-CoV-2 (1). Flere studier har vist at sensitiviteten er god ved bruk av dette materialet (2). Det egner seg dessuten godt til selvprøvetakning, noe som avlastet primærhelsetjenesten og kommunehelsetjenesten. Dette vil være spesielt gunstig i en pandemisituasjon, men vil også være nyttig i rutinesammenheng. Hensikten med denne evalueringen var å undersøke hvor egnet spytt er til påvisning av andre luftveisvirus enn SARS-CoV-2. I tillegg ønsket vi å undersøke om spyttprøve tatt tidlig på morgenen, før tannpuss og inntak av mat og drikke, vil øke testens sensitivitet.

1.2 Metoder

Spyttet ble samlet opp i enheter kalt SalivaPod som består av et munnstykke forbundet med et kammer (Conceptomed, Ballstad, Norge). Pasienten overfører deretter selv spyttet til et standard UTM-rør via en lukket kobling. Hals-/neseprøve ble tatt med standard penselprøve (eSwab, Copan diagnostics). Penselen ble først strøket mot tonsiller og ganeseil før den ble ført inn i nesen, inn til nasofarynx. Vi benyttet QIAstat-Dx (QIAGEN) som primærmetode for påvisning av 16 ulike virus. Dette er en veletablert multiplex-plattform for påvisning av adenovirus, fire endemiske koronavirus, SARS-CoV-2, metapneumovirus, influensa A-virus, influensa B-virus, fire parainfluenzavirus, rhino-/enterovirus og RS-virus (samt *B. pertussis*, *C. pneumoniae* og *M. pneumoniae*). Ved funn av viralt agens med QIAstat Dx ble prøven retestet med in-house-PCR for aktuelt virus. Dette var spesielt viktig ved funn av rhinovirus og/eller enterovirus. QIAstat-Dx-panelet omfatter kun en picornavirus-PCR som ikke skiller mellom disse nært beslektede virusene.

Hver deltaker leverte minst to prøver, heretter omtalt som prøvepar: Én hals-/neseprøve og én spyttprøve. Noen deltakere leverte to prøvepar. Dagen det første prøveparet ble tatt omtales heretter som «dag 1». Prøvepar nummer to ble tatt neste morgen i henhold til instruks angitt nedenfor. Dagen disse prøvene ble tatt er heretter omtalt som «dag 2». Prøvene ble merket med koder etter innsamling og all videre håndtering og analysering foregikk anonymisert.

Statistisk analyse av kategoriske data ble utført med Kji-kvadrattest og Fishers eksakte test. Vi benyttet Wilcoxon rank sum-test for parede data til vurdering av forskjeller i Ct-verdier mellom dag 1 og dag 2, samt til sammenligning av Ct-verdier for hals-/nese- og spyttprøver.

1.3 Omfang

I perioden november 2021 – februar 2023 gjorde vi en prospektiv innsamling av prøver fra pasienter ved Leutenhaven teststasjon i Trondheim og fra ansatte ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM). Alle prøvene var fra personer med tydelige symptomer på luftveisinfeksjon. Deltakerne avla dyp hals-/neseprøve og spyttprøve samtidig. I tillegg ba vi dem om å ta med seg utstyr til hals-/neseprøve og spyttprøve hjem, slik at de kunne levere inn et nytt sett med prøver morgenen etter første prøvetaking. Morgenprøvene skulle tas så fort som mulig etter oppvåkning, og før tannpuss, mat- eller drikkeinntak. Pasientene leverte prøver til Trondheim kommunes teststasjoner, eller til valideringsansvarlige lege ved AMM. Ti av prøvene var tatt av lege eller annet helsepersonell ved teststasjonene. De resterende prøvene var tatt av deltakerne selv, enten på seg selv eller på familiemedlemmer.

Prøvetakerne var alle helsepersonell (bioingeniører eller leger).

Alle fikk instruks om å føre penselen dypt inn i nesen, helt bak. Riktig bruk av SalivaPod var kjent for alle deltakerne fra før, ettersom slikt prøvetakingsutstyr var i rutinemessig bruk i Trondheim under pandemien.

1.4 Praktisk gjennomføring

Spytt- og penselprøvene ble samlet inn av valideringsansvarlige lege. De fleste QIAstat-Dx-undersøkelsene ble utført av bioingeniører i avdelingens prøvemottak, resterende av valideringsansvarlig LIS-lege. In-house PCR-undersøkelsene ble utført av bioingeniører ved avdelingens PCR-laboratorium. Prøver som var positive med QIAstat-Dx ble retestet med in-house-PCR. Dette ble gjort for å validere også våre in-house luftveisvirus-PCR'er til bruk på spytt. Dersom in-house-PCR ikke bekreftet funnet gjort med QIAstat Dx ble dette ansett som uttrykk for lavere sensitivitet for in-house-PCR'en. Resultatene ble derfor inkludert som positive i evalueringen. In-house-PCR-panelet ble av ressurs hensyn ikke benyttet på alle de 274 prøvene.

Vi benyttet kvalitative PCR'er, og kvalitativt samsvar ble derfor vektlagt. Sensitivitet, spesifisitet og samsvar (Cohens kapp) ble beregnet. Ct-verdier ble benyttet til relativ kvantitativ analyse. Absolutt kvantitativ analyse ble ikke utført.

I denne evalueringen har vi ikke kontrollert for symptomvarighet. Vi vurderte at dette i liten grad påvirket sammenligningen av prøvematerialene da prøvene i hvert prøvepar ble tatt samtidig. Flertallet av pasientene var nær symptomtopp ved prøvetakingstidspunktet.

1.5 Kriterier

Målet med evalueringen var først og fremst å vurdere forskjeller i sensitivitet ved PCR-undersøkelse av spytt- og hals-/neseprøve. Gullstandard mangler og vi brukte derfor hals-/neseprøve som referanse. En sensitivitet for spytt på over 80%, med hals-/neseprøve som referanse, ble ansett som akseptabelt. Kravet til samsvar målt med Cohens kapp var satt til høyere enn 0,6.

Det forventes høy spesifisitet ved bruk av validert PCR-metodikk med standard kontrollrutiner. Når man mangler gullstandard, vil man kunne se falskt lave spesifisitetstall for spytt dersom sensitiviteten for hals-/neseprøve er lavere enn for spytt. Vi satte derfor kun følgende krav til spesifisitet: Alle internkontroller og negative kontroller skulle «gå inn», og positive resultater skulle være reproducerbare ved Ct-verdier ≥ 36 eller ved avvikende amplifikasjonskurver.

1.6 Resultater

Vi mottok 137 prøvepar fra 93 pasienter og ansatte ved AMM bestående av én spyttprøve og én hals-/neseprøve – til sammen 274 prøver. Alle de 93 deltakerne leverte inn første prøvepar tatt dag 1. Førtifire av disse leverte deretter inn et nytt prøvepar tatt morgenen dag 2. Hensikten med å ta prøve neste morgen var å se om langvarig faste gjennom natten påvirket testenes sensitivitet. Deltakerne var 25% barn (alder 5-17 år) og 75% unge voksne (alder 25-50 år). Seksti prosent var kvinner.

Virus ble påvist i 190 av de 274 prøvene (118 av 186 prøver fra dag 1, og 72 av 88 prøver fra dag 2). Følgende virus ble påvist: Influenzavirus A, influenzavirus B, parainfluenzavirus 3, parainfluenzavirus 4, rhinovirus, RS-virus, SARS-CoV-2, coronavirus OC43, coronavirus NL63, coronavirus HKU1 og coronavirus 229E. Nedenfor viser vi først resultater for alle virus samlet. Deretter følger resultatene for de tre hyppigst påviste virusene.

1.6.1 Alle virus samlet, dag én

		Hals-/neseprøve		
		Pos	Neg	Totalt
Spytt	Pos	54	4	58
	Neg	6	29	35
Totalt		60	33	93

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	0,9	0,79	0,96
Spesifisitet	0,88	0,71	0,96
Cohens kapp	0,77	0,63	0,90

1.6.2 Alle virus samlet, dag én - kombinert gullstandard

Positivt resultat for ethvert funn i spytt- og/eller hals/neseprøve ble brukt som gullstandard, det vil si både konkordante og diskordante resultater for det aktuelle viruset. Funn av samme virus i aktuelt materiale ble registrert. Slik kunne sensitivitetsberegninger for de to materialene sammenlignes direkte.

		Virus påvist		
		Pos	Neg	Totalt
Spytt	Pos	58	0	58
	Neg	6	29	35
Totalt		64	29	93

		Virus påvist		
		Pos	Neg	Totalt
Hals/ nese	Pos	60	0	60
	Neg	4	29	33
Totalt		64	29	93

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet spytt	0,91	0,80	0,96
Sensitivitet hals/nese	0,94	0,84	0,98

} Ikke signifikant forskjell

	Spytt	Hals/nese
Deteksjonsrater	58/93 (62,4%)	60/93 (64,5%)

Ikke signifikant forskjell

1.6.3 Alle virus samlet, morgenprøve

		Hals-/neseprøve		
		Pos	Neg	Totalt
Spytt	Pos	35	2	37
	Neg	0	7	7
Totalt		35	9	44

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	1	0,88	1
Spesifisitet	0,78	0,40	0,96
Cohens kappa	0,85	0,64	1

1.6.4 SARS-CoV-2, dag én

		Hals-/neseprøve		
		Pos	Neg	
Spytt	Pos	18	2	20
	Neg	0	73	73
Totalt		18	75	93

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	1	0,78	1
Spesifisitet	0,97	0,90	1

1.6.5 SARS-CoV-2, morgenprøve

		Hals-/neseprøve		Totalt
		Pos	Neg	
Spytt	Pos	10	0	10
	Neg	0	34	34
Totalt		10	34	44

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	1	0,66	1
Spesifisitet	1	0,87	1

1.6.6 Influenza A, dag én

		Hals-/neseprøve		Totalt
		Pos	Neg	
Spytt	Pos	11	1	12
	Neg	2	79	81
Totalt		13	80	93

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	0,85	0,54	0,97
Spesifisitet	0,99	0,92	1

1.6.7 Influenza A, morgenprøve

		Hals-/neseprøve		
		Pos	Neg	Totalt
Spytt	Pos	11	1	12
	Neg	0	32	32
Totalt		11	33	44

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	1	0,68	1
Spesifisitet	0,97	0,82	1

1.6.8 Rhinovirus, dag én

		Hals-/neseprøve		
		Pos	Neg	Totalt
Spytt	Pos	9	1	10
	Neg	3	80	83
Totalt		12	81	93

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	0,75	0,43	0,93
Spesifisitet	0,99	0,92	1

1.6.9 Rhinovirus, morgenprøve

		Hals-/neseprøve		
		Pos	Neg	Totalt
Spytt	Pos	4	0	4
	Neg	0	40	40
Totalt		4	40	44

	Estimert verdi	95% konf intervall	
Sensitivitet	1	0,40	1
Spesifisitet	1	0,89	1

1.6.10 Ct-verdier i prøver fra dag én og dag to

Prøver fra pasienter med positivt resultat begge dager ble inkludert i disse analysene. Vi sammenlignet Ct-verdier prøvepar for prøvepar, slik at kun Ct-verdier for samme virus-PCR ble sammenlignet. Ulike PCR'er med noe ulik effektivitet vil riktignok inngå i analysen, men differansene som beregnes parvis vil alle gjelde samme PCR.

1.6.10.1 Ct-verdier i spyttprøver tatt dag 1 sammenlignet med Ct-verdier i spyttprøver tatt dag 2, undersøkt med QIAstat-Dx

- N=25
- Gjennomsnitt Ct-verdi dag 1: 30,0
- Gjennomsnitt Ct-verdi dag 2: 28,4
- Median Ct-verdi dag 1: 30,0 (95% CI 27,54 til 33,17)
- Median Ct-verdi dag 2: 29,4 (95% CI 25,04 til 32,04)
- $p=0,004$ (Wilcoxon)

1.6.10.2 Ct-verdier i hals-/neseprøver tatt dag 1 sammenlignet med Ct-verdier i hals-/neseprøver tatt dag 2, undersøkt med QIAstat-Dx

- N=32
- Gjennomsnitt Ct-verdi dag 1: 26,2
- Gjennomsnitt Ct-verdi dag 2: 25,5
- Median Ct-verdi dag 1: 27,4 (95% CI 23,50 til 29,50)
- Median Ct-verdi dag 2: 24,7 (95% CI 23,20 til 27,00)
- $p=0,41$ (Wilcoxon)

Resultatene gjengitt ovenfor tyder på at spytt tatt som morgenprøve dag 2 inneholder mer virus enn spytt tatt i løpet av dag 1. Forskjellene i Ct-verdi kan også skyldes naturlig utvikling i sykdomsforløpet, men i så fall ville vi forventet en signifikant differanse også for hals-/neseprøver. Dette var ikke tilfelle. Vi fant tilsvarende resultater da vi sammenlignet Ct-verdiene med in-house PCR. Viruskonsentrasjonen så med andre ord ut til å øke i spytt som hadde stått i spyttkjertlene natta gjennom. Hung et al 2020 gir støtte til en slik hypotese (3). I to studier der morgenprøver ble benyttet fant man dessuten svært høye sensitivitetstall for SARS-CoV-2 ved bruk av spytt som materiale (1, 4).

1.6.11 Ct-verdier i spyttprøver sammenlignet med Ct-verdier i hals-/neseprøver

- N=26
- Hals/nese gjennomsnitt 26,1
- Spytt gjennomsnitt 30,7
- Median Ct-verdi hals/nese: 27,0 (95% CI 22,59 til 29,06)
- Median Ct-verdi spytt: 32,2 (95% CI 29,21 til 33,50)
- $p=0,002$ (Wilcoxon)

Det var signifikant lavere Ct-verdier i hals-/neseprøvene enn i spyttprøvene. Dette er som ventet og viser at viruskonsentrasjonene nådde høyere nivåer i hals-/neseslimhinnen enn i spytt (5). Det var som nevnt stor grad av samsvar da vi sammenlignet kvalitative resultater. Dette tyder på at PCR utført på begge

prøvematerialer blir positive i et tidsrom som er tilnærmet sammenfallende, men at viruskonsentrasjonen når høyere nivåer i hals-/neseslimhinnen i dette tidsrommet.

1.6.12 Bekreftelsestesting utført på QIAstat-Dx-positive prøver

I fire av 190 tilfeller ble et positivt resultat med QIAstat-Dx ikke bekreftet med in-house-PCR (to influensa A-virus-, ett rhinovirus- og ett coronavirus HKU1-tilfelle). Dette utgjør 2 % av de positive prøvene, noe som ansees som et godt resultat. Alle de 274 prøvene i materialet ble ikke testet med in-house-PCR. Funnrater for QIAstat-Dx på in-house-PCR-positive prøver kunne derfor ikke beregnes.

1.7 Praktisk egnethet / Brukervennlighet

God.

Spyttprøver tatt med SalivaPod er enkle å håndtere i laboratoriet. Pasientene bør få veiledning om hvordan prøvetakingen utføres. Alternativt anbefales gjennomsyn av veiledningsvideo på følgende nettside: <https://salivapod.com/no/>.

1.8 Kostnadsberegning

SalivaPod er dyrere enn prøvepensler, men man vil på den annen side spare ressurser til prøvetaking og prøvehåndtering på legekantorene. En nærmere beregning av dette er ikke gjort.

1.9 Konklusjon

Det var meget godt kvalitativt samsvar mellom spytt- og hals-/neseprøver når de ble brukt til påvisning av luftveisvirus. Dette har også vært vist i tidligere studier for flere ulike luftveisvirus (2, 5-8). Spyttprøve tatt om morgenen, før tannpuss og inntak av mat og drikke, ga best resultater og anbefales som førstevalg.

Spytt og penselprøve fra hals/nese ansees dermed som likeverdige materialer til påvisning av luftveisvirus, og spyttprøver kan benyttes i rutinediagnostikken av virale luftveisinfeksjoner i primærhelsetjenesten.

Bruk av spyttprøver i den daglige rutine vil også være gunstig i beredskapssammenheng. Oppskalering til massetesting av spyttprøver i forbindelse med nye pandemier vil med dette være enklere.

Følgende luftveisvirus ble ikke påvist i denne undersøkelsen: Adenovirus, metapneumovirus, humant bocavirus og parainfluenzavirus 1 og 2. «Spiking»-forsøk vil bli utført for disse virusene.

1.10 Referanser

1. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(13):1283-6.
2. Duncan DB, Mackett K, Ali MU, Yamamura D, Balion C. Performance of saliva compared with nasopharyngeal swab for diagnosis of COVID-19 by NAAT in cross-

-
- sectional studies: Systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem.* 2023;117:84-93.
3. Hung DL, Li X, Chiu KH, Yip CC, To KK, Chan JF, et al. Early-Morning vs Spot Posterior Oropharyngeal Saliva for Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection: Implication of Timing of Specimen Collection for Community-Wide Screening. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(6):ofaa210.
 4. Rao M, Rashid FA, Sabri FSAH, Jamil NN, Zain R, Hashim R, et al. Comparing Nasopharyngeal Swab and Early Morning Saliva for the Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical Infectious Diseases.* 2020;72(9):e352-e6.
 5. 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. *Clinical Microbiology and Infection.* 2019;25(3):372-8.
 6. Kim YG, Yun SG, Kim MY, Park K, Cho CH, Yoon SY, et al. Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2017;55(1):226-33.
 7. Kiryanov SA, Levina TA, Kadochnikova VV, Konopleva MV, Suslov AP, Trofimov DY. Clinical Evaluation of Nasopharyngeal, Oropharyngeal, Nasal Swabs, and Saliva for the Detection of SARS-CoV-2 by Direct RT-PCR. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(5).
 8. Miguères M, Mansuy JM, Vasseur S, Claverie N, Lougarre C, Soulier F, et al. Omicron Wave SARS-CoV-2 Diagnosis: Evaluation of Saliva, Anterior Nasal, and Nasopharyngeal Swab Samples. *Microbiol Spectr.* 2022;10(6):e0252122.