

## 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 i SARS-CoV-2-diagnostikken (1). Flere studier har vist at sensitiviteten er god ved bruk av dette materialet (2). Det egner seg dessuten godt til selvprøvetakning, noe som avlaster primærhelsetjenesten og kommunehelsetjenesten. Dette vil være spesielt gunstig i en pandemisituasjon, men også i rutinesammenheng. Med denne evalueringen ønsket vi å undersøke hvor egnet spytt er til påvisning av andre luftveisvirus enn SARS-CoV-2. I tillegg ønsket vi å undersøke om spyttprøve avlagt 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 neseprøve (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 PCR som ikke skiller mellom disse nært beslektede virusene.

Hver deltaker avla minst to prøver, heretter omtalt som prøvepar: Én hals-/neseprøve og én spyttprøve. Noen deltakere avla 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».

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. Vi anonymiserte resultatene før statistiske beregninger ble utført.

---

### 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. 10 av prøvene er tatt av lege eller annet helsepersonell ved teststasjonene. De resterende prøvene er 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 fra før 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. Flertallet av pasientene var dog nær symptomtopp rundt prøvetakingstidspunkt. Vi vurderte at dette i liten grad påvirket sammenligningen av prøvematerialene da hvert prøvepar ble tatt samtidig.

### 1.5 Kriterier

I denne evalueringen var målet 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, kan man 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  $\geq 36$  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). 60% 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: Influensavirus A, influensavirus 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 kappa	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		
		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		
		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 1: 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 for in-house PCR. Virus konsentrasjonen 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 virus konsentrasjonene 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.

## 1.7 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. 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. Spyttprøver kan benyttes i rutinediagnostikken av virale luftveisinfeksjoner i primærhelsetjenesten.

Bruk av spyttprøver vil også være gunstig i beredskapssammenheng. Oppskalering til massetesting av spyttprøver i forbindelse med nye pandemier vil dermed være enklere.

Følgende luftveisvirus ble ikke påvist i denne undersøkelsen: Adenovirus, metapneumovirus, humant bocavirus og parainfluenzavirus 1 og 2. Forsøk med simulerte spyttprøver der disse virusene tilsettes vil bli utført.

## 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.