

Serologie in de diagnose van enterovirusgerelateerde ziekte

Karen Couderé, Katja Wolthers, Jean-Luc Murk

Samenvatting

Serologie biedt een meerwaarde bij complicaties als gevolg van late non-polio enterovirusinfectie, wanneer het virus niet (meer) direct aantoonbaar is. Verschillende targets en technieken bestaan voor de detectie van antistoffen, onder meer 'enzyme linked immunosorbent' assays. In het geval van centraal-zenuwstelselinfecties dient een liquorserum-antistof-index bepaald te worden. Ondanks de uitdaging van kruisreagerende antistoffen worden multiplexsystemen steeds meer onderzocht en toegepast.

Abstract

Serology can provide additional value in the case of non-polio enterovirus infection associated complications. Different targets and techniques exist for the measurement of antibodies, including enzyme-linked immunosorbent assays. When central nervous system infections occur intrathecal antibody production should be determined. Despite the main challenge of cross-reacting antibodies, multiplex systems are increasingly applied.

Introductie

Enterovirussen (EV) zijn een zeer frequente oorzaak van infecties, vooral bij kinderen en in mindere mate volwassenen. Het klinische beeld is in de meerderheid van de gevallen mild en beperkt tot koorts en aspecifieke verschijnselen. Tot het klinisch spectrum behoren echter ook ernstig verlopende infecties zoals neonatale sepsis, myocarditis en neurologische complicaties. De diagnose wordt in Nederland gesteld met behulp van PCR. Deze methode is echter niet afdoende bij late complicaties zoals myocarditis, acute slappe verlamming (AFM of acute flaccid myelitis) en encefalitis. Hoewel EV-serologie sinds de opkomst van de moleculaire diagnostiek het imago heeft van aspecifiek en weinig zinvol te zijn, bieden serologische assays hier een bijzondere meerwaarde. Met dit artikel willen wij een overzicht bieden van een aantal

beschikbare serologische technieken en hun voordelen en beperkingen ten opzichte van elkaar en andere diagnostische methodes.

Classificatie en associatie met ziektebeelden

Enterovirussen behoren tot het genus Enterovirus van de Picornaviridae-familie, de grootste familie van RNA-virussen. Hun nomenclatuur schept regelmatig verwarring en veranderde grondig met de introductie van genotypering waarna de coxsackievirus A (CVA), -B (CVB), echovirussen (E) en poliovirus (PV) 1-3, op basis van sequentiehomologie en fylogenetische eigenschappen werden gehergroepeerd onder de vier EV-species, Enterovirus (EV-) A, B, C en D (*tabel 1*). Vanaf dat moment kregen alle nieuw ontdekte EV-types een genummerde EV-naam, gebaseerd op het species waartoe ze behoren en de opeenvolging van ontdekking, beginnend vanaf EV-D68. Wanneer men over non-polio enterovirussen (NPEV) spreekt bedoelt men alle EV behalve wildtype- en vaccin-PV.

Ondertussen zijn er meer dan 110 NPEV-types bekend. Hun circulatie is complex, en afhankelijk van het type is er een twee-, meerjaarlijkse of meer irreguliere toename van het aantal infecties.

De verschillende NPEV-types zijn geassocieerd met verschillende ziektebeelden (*tabel 2, pagina 26*). Dit kan echter variëren in de tijd omdat er soms veranderingen in circulatie en pathogeniciteit ontstaan. Types behorend tot EV-B, het species waartoe de meeste types behoren, veroorzaken meningitis,

Laboratorium voor Medische microbiologie en Immunologie, Microvida, Elisabeth TweeSteden Ziekenhuis, Tilburg, drs.K. Couderé, aios medische microbiologie, dr. J. Murk, arts-microbioloog.
Amsterdam UMC, Locatie AMC, Amsterdam, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, OrganoVIR Labs, dr. C. Wolthers, arts-microbioloog/viroloog.
Correspondentieadres: drs. K. Couderé
(k.coudere@etz.nl).

myocarditis en neonatale sepsis. EV-A types zijn dan weer klassiek geassocieerd met hand-voet-mondziekte (HFMD of hand foot mouth disease). In geval van EV-A71 kan dit gecompliceerd worden door (hersenstam)encefalitis [1]. Van de meeste EV-C-types (behalve PV1-3, CVA21, CVA24) is de associatie met ziekte grotendeels onbekend. Het meest beruchte EV-D-type, EV-D68, kent sinds 2010 een tweejaarlijkse toename met uitbraken van ernstige respiratoire ziekte en acute slappe verlamming (AFM of acute flaccid myelitis) in Europa en de Verenigde Staten [2,3] (een complicatie die voor de introductie van polio vaccinatie voornamelijk door PV-types werd veroorzaakt). Voor EV-A-, -B- en -C-species is er bovendien, in toenemende mate, bewijs voor een associatie met diabetes mellitus type 1 (DM1) [4,5].

Directe diagnostiek

Vóór de introductie van moleculaire diagnostiek was men aangewezen op het kweken van klinische materialen op cellijnen gevolgd door serotypering op basis van EV-antilichaampools [6]. Tegenwoordig

wordt in Nederland en andere westerse landen de diagnose meestal gesteld met RT-PCR, gericht op het geconserveerde 5'Untranslated region (5'UTR) [7], en typering via de basenvolgorde van het Viral capsid Protein (VP)-1 [8]. Diagnostische materialen zijn veelal liquor-, faeces- of keeluitstrijk, maar ook bloed of blaasjesvocht [9]. Het virus blijft het langste aantoonbaar in faeces. Niet-enterotrope NPEV-types, zoals EV-D68, zijn hierin echter zelden aantoonbaar (figuur 1).

De voordelen van serologische diagnostiek

Een indirecte methode voor het stellen van de diagnose van NPEV-infecties is het aantonen van een antistofrespons. De humorale respons speelt een belangrijke rol in het overwinnen van NPEV-infecties. Het opkomen van een IgM-respons treedt vroeg en binnen drie tot acht dagen op en kan tot twee maanden aanwezig blijven (over het algemeen niet langer dan zes maanden) [10,11]. Dit is in tegenstelling tot de viremische fase, die hoogstens een aantal dagen duurt (figuur 1). De neutraliserende antistoffen (nAS) blijven

Tabel 1. Classificatie van NPEV en de associatie met ziektebeelden.

Species	Types	Ziektebeelden	
Enterovirus A	CVA2-8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16 EV-A71, EV-A76, EV-A89-92, EV-A114, EV-A119-121	CVA6, CVA16, EV-A71 EV-A71 EV-A71, CVA7	HFMD Encefalitis AFM
Enterovirus B	CVA9, CVB1-6 E1-9, E11-21, E24-27, E29-33 EV-B69, EB73-75, EV-B77-88, EVB-93, EV-B97-98, EV-B100-101, EV-B106-107, EV-B110-110	CVB, E11 CVB Echovirussen CVB, echovirussen	neonatale sepsis (hepatitis en myocarditis) myocarditis meningitis pleurodynie
Enterovirus C	PV-1-3 CVA1, CVA11, CVA13, CVA17, CVA19-22, CVA24 EV-C95-96, EV-C99, EV-C102, EV-C104-105, EV-C109, EV-C113, EV-C116-118	PV-1-3 CVA21, CVA24 CVA24 Overige	AFM respiratoire ziekte hemorragische conjunctivitis ziekteassociatie grotendeels onbekend
Enterovirus D	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111	EV-D68 EV-D70	ernstige respiratoire ziekte, AFM hemorragische conjunctivitis

langdurig (jaren) aanwezig. Antistoffen zijn hoofdzakelijk gericht tegen de drie externe structurele capside-eiwitten VP1, VP2 en VP3, waarvan VP1 de meeste sequentievariatie en neutraliserende epitopen bevat. Behalve typespecifieke epitopen bevat VP1 ook een belangrijke pan-EV-immunodominante site ter hoogte van de N-terminale regio [12,13]. Recent rapporteerden verschillende onderzoeksgroepen over de niet-structurele 2A- and 3C-proteasen als IgG-target [14,15]. Deze respons is van korte duur en kan als marker voor acute infecties dienen.

De kracht van serologische assays is het diagnosticeren van later optredende complicaties zoals onder andere myocarditis, DM1, AFM en (hersenstam)encefalitis. Bij deze ziektebeelden is het virus vaak niet (meer) direct aantoonbaar of slechts aantoonbaar in niet-steriel respiratoir materiaal of feces. Bij AFM, een gevreesde complicatie van EV-D68 infecties, wordt het virus zelden of nooit aangetoond in de liquor en in minder dan de helft van de gevallen in niet-steriel respiratoir materiaal [16]. Tekenen van AFM starten gemiddeld pas vanaf vijf tot zeven dagen na de eerste symptomen en de aanwezigheid van dit niet-enterotrope virus in respiratoir materiaal, bloed of liquor is vaak van korte duur [16]. Ook bij encefalitis, als gevolg van een EV-A71-infectie, wordt het virus vaak niet meer in de liquor aangetoond. Een centraal-zenuwstelselinfectie kan in deze gevallen aangetoond

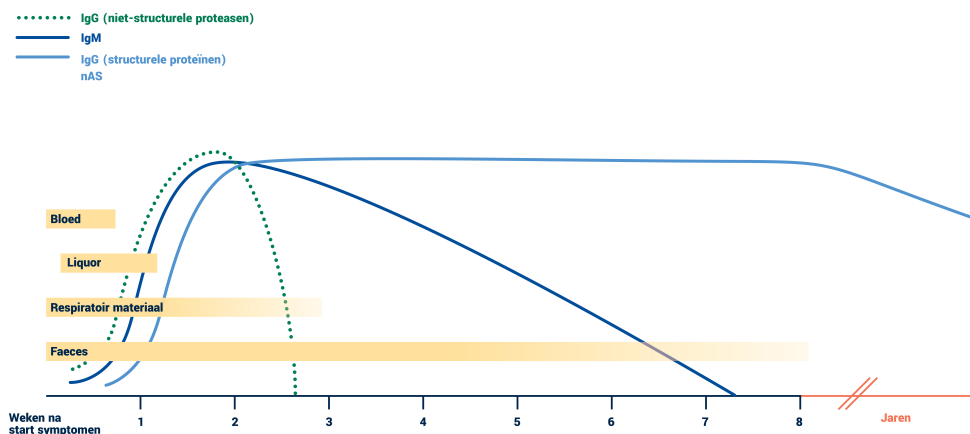
worden via intrathecale antistofsynthese door het berekenen van een antistofindex tussen liquor en serum. Verschillende studies rapporteerden dat het aantonen hiervan de diagnostische sensitiviteit aanzienlijk kan verhogen [1,17].

Serologische technieken

Neutralisatieassays

De gouden standaard voor het bepalen van antistoffen tegen NPEV is de op het cytopathogeen effect (CPE) gebaseerde virusneutralisatieassay (VNA) of de plaquereductie-neutralisatieassay (PRNA). Aangezien de initiële classificatie van EV gebaseerd was op serotypering, waarbij de neutraliserende antistoffen (nAS) tegen een bepaald type geen andere types konden neutraliseren, worden nAS in principe als (sero)typespecifiek beschouwd. De VNA is echter bewerkelijk, heeft een lange incubatieduur (vijf tot zeven dagen) en vergt de beschikbaarheid van voldoende materiaal. Voor het bepalen van nAS tegen verschillende NPEV-types moeten immers al de individuele types in kwestie gekweekt en al dan niet geneutraliseerd worden. Recent werd een aantal alternatieven voor het meten van nAS ontwikkeld zoals de pseudovirusluciferase-assay (PVLA) en de neutralisatie-'enzyme linkt immunospot' (ELISPOT). Bij deze assays hoeft niet gewacht te worden op CPE

Figuur 1. Tijdsframe RNA-detectie in klinische materialen en kinetiek antistofrespons



maar correleert een afname van het signaal door luciferase- of VP1-gekoppelde monoclonale antistoffen, met de inhibitie van virale invasie door nAS [18-20]. De kortere incubatieduur (minder dan 24 uur) en een automatische aflezing van het signaal maken deze assays geschikt als methodes met hoge doorloopsnelheid. Deze assays werden echter ontwikkeld voor een beperkt aantal types (onder andere EV-A71, CVB3, CVB5) (19-22).

Complementbindingsreactie (CBR)

Een in het verleden vaker gebruikte techniek is de complementbindingsreactie (CBR). Deze techniek is minder gevoelig en minder specifiek dan de huidige 'enzyme linked immunosorbent' assays (ELISA) [23]. Daarenboven is er om een acute infectie aan te tonen een viervoudige titer stijging vereist. Hierdoor kan de diagnose pas laat gesteld kan worden. Daarenboven is er voor deze en in-house ontwikkelde testen geen plaats meer met de beschikbaarheid van In Vitro Diagnostics Regulation (IVDR) CE-gecertificeerde assays.

Commerciële 'enzyme linked immunosorbent' assays (ELISA)

Verscheidende commerciële ELISA's zijn beschikbaar voor het meten van IgM, IgG en IgA tegen EV (tabel 2, pagina 26). De uitvoer vergt geen bijzonder materiaal of bijzondere expertise, wat deze technieken toegankelijk maakt. De targets bestaan uit een mix van recombinante of gedenatureerde EV-antigenen waardoor ze antistoffen kunnen aantonen tegen verschillende types. De Serion ELISA is een kwantitatieve assay gevalideerd voor serum en liquor, die de mogelijkheid biedt voor het bepalen van een antistofindex [24]. Met geen van deze assays kan echter een onderscheid gemaakt worden tussen de EV-typen waartegen de antistoffen gevormd zijn. Ondanks dat kruisreactiviteit tegen PV en andere EV die niet als target in de assay zijn opgenomen, niet uit te sluiten is, tonen deze commerciële ELISA's een hoge specificiteit. Dit maakt kruisreactiviteit door polio-vaccinatie geïnduceerde antistoffen minder waarschijnlijk. Bij twijfel kunnen IgM en IgA helpen bij de interpretatie van het resultaat.

Voor de IgM-bepalingen is ook kruisreactiviteit door andere verwekkers beschreven (onder meer voor EBV-VCA, *Borrelia*, TBEV, bof). Daarnaast is de sensitiviteit

van de assays voor alle individuele EV-types onvoldoende bekend.

Recente ontwikkelingen met behulp van multiplexassays

Multiplexmethodes kunnen mogelijk een uitweg bieden uit de beperkingen van serologische assays die geen specifiek NPEV-types kunnen aanduiden. Recent rapporteerden Mishra et al. over het bepalen van intrathecale antistoffen aan de hand van een zelfontwikkelde peptide microarray 'AFM-serochip', die de vier capsid-eiwitten (VP1, VP2, VP3, en VP4) van alle humane EV omvatten. Met deze techniek kon bij 80 procent van de geïncubeerde AFM-casussen intrathecale AS-synthese tegen EV-D68 worden aangetoond [25]. Een andere techniek waarbij een grote hoeveelheid virale peptidetargets gecombineerd kan worden, is Virscan [1,17]. Deze techniek maakt gebruik van expressie van peptiden door DNA-gecodeerde bacteriofagen. Bacteriofagen waaraan antilichamen binden worden gescheiden en hun DNA-code wordt bepaald, waarna een vergelijking met een virale peptidedatabase kan worden gemaakt. Hoewel deze technieken werden toegepast in liquor, werden er geen antistofindexen bepaald die rekening houden met bloed-hersenbarrièredisfunctie.

Ook werden er proteïnegebaseerde multiplexassays ontwikkeld. Saarinen et al. maakten via het flexibele MSD U-PLEX-systeem gebruik van VP1-proteïnen van ieder EV-species (CVA-4, CVB1, PV1, EV-D68) naast 2A- en 3C-proteasen, als marker voor acute infectie. Hierbij vonden ze een significant hogere antistofrespons tegen 2A bij IgM-positieve vs. IgM-negatieve volwassenen. De verschillende VP1-proteïnen vertoonden echter een hoge mate aan kruisreactiviteit bij volwassenen [26]. Ook andere flexibele multiplexplatformen zouden zich kunnen lenen voor EV-serologie, zoals de Luminex xMAP-technologie (eigen data, nog niet gepubliceerd).

Uitdagingen serologische technieken

Op dit moment zijn er geen commerciële NPEV-typespecifieke assays in Europa beschikbaar. Het kunnen aanduiden van een type heeft aanvullende waarde vanwege de associatie tussen bepaalde types en ziektebeelden. Dit kan de betrokkenheid van een NPEV bij het zich presenterende ziektebeeld meer of

Tabel 2. Overzicht van CE-gecertificeerde commerciële EV-ELISA's.

Producent en naam assay	Antigeentype	Gebruikte EV-types voor assay-ontwikkeling	Te detecteren EV-types volgens voorschrift	Ig-isotypes	Kwantitatief	Patiënt-materiaal	Volume
Serion ELISA classic Enterovirus	Mix van recombinante antigenen van geconserveerde en subtype-specifieke VP1-epitopen	E6 E9 CVB1, -3 en -5	Alle EV-serotypes	IgM IgA IgG	Ja	Serum en liquor	100 µL
Serion ELISA classic Echovirus	Mix	E6 E9	Alle echoserotypes	IgM IgA IgG	Ja	Serum en liquor	100 µL
Serion ELISA classic Coxsackievirus	Mix	CVB1, -3 en -5	Alle coxsackie-serotypes	IgM IgA IgG	Ja	Serum en liquor	100 µL
Virotech Enterovirus ELISA	Hittegedenatureerde antigenen	CVB5 E24	Ten minste CVA9, CVA16, CVB2, CVB4, E5, E11, E15, E17, E22, E23, E25, E33	IgM IgA IgG	Semi-kwantitatief	Serum	10 µL
Euroimmune anti-Enterovirus ELISA	Recombinant VP1	Niet gespecificeerd (coxsackie- en echovirussen)	Coxsackie- en echovirussen	IgM IgA IgG	Semi-kwantitatief	Serum en plasma (EDTA of heparine)	10 µL

minder waarschijnlijk maken. Bovendien is het in het kader van surveillance nuttig om te weten om welk type het gaat. Het ontwikkelen van typespecifieke multiplexassays wordt bemoeilijkt door het feit dat er bij een NPEV-infectie niet alleen homotypische antistoffen maar ook kruisreagerende heterotypische antistoffen worden gevormd tegen zogeheten *common enterovirus cross-reactive sequences* (CERCS) [12,13]. De neutraliserende typespecifieke epitopen werden al voor verschillende EV-types uitgezocht (onder meer voor EV-A71, EV-D68, CVA16) maar met de meer dan 100 verschillende NPEV-types blijft dit een enorme uitdaging. Bovendien zijn sommige van deze epitopen conformationeel: ze komen niet terug in serologische assays gebaseerd op lineaire peptiden. Er lijken ook verschillen te bestaan tussen de

antistofrespons van kinderen en volwassenen, waarbij de antistofrespons van volwassenen, vanwege de veelvuldige blootstelling aan EV, uit meer kruisreagerende en vroeger optredende antistoffen bestaat [5,26].

Hierdoor kan gemakkelijker een bepaald type aangeduid worden, maar dit heeft als nadeel dat, wanneer niet alle types zijn geïnccludeerd in de assay, de sensitiviteit lager is. Een bijkomende belangrijke uitdaging is om tijdig aan het uitvoeren van EV-serologie te denken. Voornamelijk bij neurologische complicaties - waarbij er differentiaaldiagnostisch ook aan auto-immuunziekten wordt gedacht - bestaat het risico dat het toedienen van IVIG of plasmaferese de interpretatie van de daaropvolgende serologische diagnostiek onmogelijk maakt. Omdat IVIG nAS tegen

de meest voorkomende EV-types bevat, kan dit leiden tot een foutpositieve uitslag [27].

Conclusie en aanbevelingen

Bij late NPEV-complicaties, zoals myocarditis, AFM en encefalitis, kunnen serologische technieken de diagnostische sensitiviteit verhogen. Commerciële ELISA's, voornamelijk gericht tegen coxsackie- en echovirussen, zijn beschikbaar. Het is belangrijk om de mogelijkheid van een NPEV-infectie in het achterhoofd te houden en de serologische diagnostiek zo spoedig mogelijk in te zetten, voor het toedienen van IVIG. Bij neurologische complicaties kan een liquorserum-antistofindex bepaald worden. Deze diagnostiek vindt plaats in het Erasmus MC (Diagnostisch Vademecum Infectieziekten tabel). Vanwege de associatie tussen bepaalde EV-types en ziektebeelden zoals AFM, encefalitis en myocarditis, is er behoefte aan technieken die met een hogere sensitiviteit specifieke NPEV-types kunnen aanduiden. Omdat genen evolueren en hun circulatie en ziekteverwekkend vermogen voortdurend veranderen, kunnen flexibele multiplexplatforms hier een oplossing bieden.

Referenties

1. Leon KE, Schubert RD, Casas-Alba D, et al. Genomic and serologic characterization of enterovirus A71 brainstem encephalitis. *Neuro Immunol Neuroinflamm.* 2020;7(3).
2. Midgley CM, Watson JT, Nix WA, et al. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med.* 2015;3(11):879-87.
3. Meijer A, van der Sanden S, Snijders BE, et al. Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in The Netherlands in 2010. *Virology.* 2012;423(1):49-57.
4. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ.* 2011;342:d35.
5. King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *Lancet.* 1983;1(8339):1397-9.
6. Duizer E BK, Uslu G, Jusic E, et al. Verleden, heden en toekomst van de enterovirus- en parechovirusdiagnostiek en -surveillance in Nederland. *NTMM.* 2013;21(2):6.
7. Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3666-70.
8. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2698-704.
9. Harvala H, Broberg E, Benschop K, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol.* 2018;101:11-7.
10. Yu N, Guo M, He SJ, et al. Evaluation of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 specific immunoglobulin M antibodies for diagnosis of hand-foot-and-mouth disease. *Virol J.* 2012;9:12.
11. Aw-Yong KL, Sam IC, Koh MT, Chan YF. Immunodominant IgM and IgG Epitopes Recognized by Antibodies Induced in Enterovirus A71-Associated Hand, Foot and Mouth Disease Patients. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165659.
12. Samuelson A, Forsgren M, Sallberg M. Characterization of the recognition site and diagnostic potential of an enterovirus group-reactive monoclonal antibody. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2(3):385-6.
13. Ding Y, Wang Z, Zhang X, et al. Different Antibody Response against the Coxsackievirus A16 VP1 Capsid Protein: Specific or Non-Specific. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162820.
14. Saarinen NVV, Stone VM, Hankaniemi MM, et al. Antibody Responses against Enterovirus Proteases are Potential Markers for an Acute Infection. *Viruses.* 2020;12(1).
15. Chen X, Qin B, Shi M, et al. Immunoreactivity Analysis of the Nonstructural Proteins of Human Enterovirus 71. *Viral Immunol.* 2017;30(2):106-10.
16. Greninger AL, Naccache SN, Messacar K, et al. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012-14): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(6):671-82.
17. Schubert RD, Hawes IA, Ramachandran PS, et al. Pan-viral serology implicates enteroviruses in acute flaccid myelitis. *Nat Med.* 2019;25(11):1748-52.
18. Wu X, Mao Q, Yao X, et al. Development and evaluation of a pseudovirus-luciferase assay for rapid and quantitative detection of neutralizing antibodies against enterovirus 71. *PLoS One.* 2013;8(6):e64116.
19. Yang L, He D, Tang M, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent spot assay to measure serum-neutralizing antibodies against coxsackievirus B3. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(3):312-20.
20. Zhang H, An D, Liu W, et al. Analysis of cross-reactive neutralizing antibodies in human HFMD serum with an EV71 pseudovirus-based assay. *PLoS One.* 2014;9(6):e100545.
21. Chen P, Wu X, Mao Q, et al. A rapid and quantitative assay for measuring neutralizing antibodies of Coxsackievirus B3. *J Virol Methods.* 2016;232:1-7.
22. Chen P, Wu X, Su Y, Hao X, Mao Q, Liang Z. Development of a pseudovirus based assay for measuring neutralizing antibodies against coxsackievirus B5. *J Virol Methods.* 2017;246:21-6.
23. Terlitskaia-Ladwig E, Metzger C, Schalasta G, Enders G. Evaluation of enterovirus serological tests IgM-EIA and complement fixation in patients with meningitis, confirmed by detection of enteroviral RNA by RT-PCR in cerebrospinal fluid. *Journal of medical virology.* 2000;61(2):221-7.
24. Sooksawasdi Na Ayudhya SSGJ, Bogers S, Leijten LME, et al. Detection of intrathecal antibodies to diagnose enterovirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol.* 2022(152).
25. Mishra N, Ng TFF, Marine RL, et al. Antibodies to Enteroviruses in Cerebrospinal Fluid of Patients with Acute Flaccid Myelitis. *mBio.* 2019;10(4).
26. Saarinen NVV, Lehtonen J, Veijola R, et al. Multiplexed High-Throughput Serological Assay for Human Enteroviruses. *Microorganisms.* 2020;8(6).
27. Coudere K, van der Straten K, Brouwer L, et al. Neutralising Antibodies against Enterovirus and Parechovirus in IVIG Reflect General Circulation: A Tool for Sero-Surveillance. *Viruses.* 2021;13(6).