

Evaluación de diferentes muestras clínicas y líneas celulares en el aislamiento de Enterovirus en pacientes pediátricos

Jordi Reina, Francisca Ballesteros, María Munar, Margarita Mari y Margarita Subirats

Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Son Dureta (UIB). Palma de Mallorca.

FUNDAMENTO: Evaluar prospectivamente la eficacia de diferentes muestras clínicas y líneas celulares en el aislamiento de Enterovirus en pacientes pediátricos.

MÉTODOS: Durante el periodo comprendido entre julio de 1997 y julio de 1999 se han analizado muestras procedentes de 102 lactantes (< 2 años) con un síndrome febril de etiología desconocida. Todas las muestras tras su descontaminación fueron sembradas en las líneas celulares MRC-5, Hep-2 y Vero mediante el sistema shell-vial. A los 2-3 días de incubación a 37 °C las monocapas fueron reveladas con un anticuerpo monoclonal anti-VP1, siendo las cepas posteriormente identificadas como Poliovirus, ECHO-virus y Coxsackie mediante anticuerpos específicos.

RESULTADOS: Se han estudiado 96 muestras (45 de frotis faríngeo, 28 de heces, 13 de líquido cefalorraquídeo, 5 de sangre, 4 de orina y un lavado broncoalveolar). En 48 pacientes (47%) se aisló algún Enterovirus, correspondiendo a 60 muestras (62,5%). Se aislaron Enterovirus en el 75,5% de los frotis faríngeos, el 71,4% de las heces, el 30,7% de los líquidos cefalorraquídeos, uno en sangre (20%) y en el lavado broncoalveolar. En 28 pacientes se disponía de forma simultánea de un frotis faríngeo y de heces; en este grupo, el empleo simultáneo de ambos permitió el diagnóstico en 26 casos (92,8%). De los 60 Enterovirus aislados, 59 (98,3%) lo fueron en la línea MRC-5, 23 (38,3%) en la Hep-2 y 14 (23,3%) en la Vero, observándose diferencias significativas entre la MRC-5 y las restantes. De los 60 Enterovirus aislados, 30 (50%) fueron identificados como ECHO-virus, 15 (25%) como Poliovirus vacunal, 12 (20%) no pudieron ser tipificados y 3 (5%) no crecieron. La línea MRC-5 ha resultado ser significativamente superior para el aislamiento de cada uno de los diferentes tipos de Enterovirus.

CONCLUSIONES: Para la obtención del máximo rendimiento diagnóstico frente a la sospecha de infección por Enterovirus es necesario utilizar varias muestras,

preferentemente las más cercanas al foco infeccioso (líquido cefalorraquídeo y sangre). La línea celular MRC-5 ha resultado ser la más eficaz en el aislamiento de los Enterovirus independientemente del tipo de muestra o del género vírico. El método de shell-vial permite el aislamiento y la identificación de los Enterovirus aislados en muestras clínicas.

Palabras clave: Enterovirus. Muestras clínicas. Líneas celulares. Shell-vial.

Evaluation of different clinical samples and cell lines in the isolation of enterovirus in pediatric patients

BACKGROUND: To evaluate prospectively the efficacy of different clinical samples and cellular lines in the isolation of Enteroviruses from pediatric patients.

METHODS: In the period July-1997 to July-1999 we analyze the samples of 102 pediatric patients (< 2 years old) with an unknown febrile etiology syndrome. After the process of decontamination the samples were inoculated in the MRC-5, Hep-2 and Vero cell lines by the shell-vial assay. After 2-3 days of incubation the monolayers were stained by a monoclonal antibody against VP1; then the strains were identified as Poliovirus, ECHO-virus or Coxsackie by specific antibodies.

RESULTS: 96 clinical samples were studied (45 pharyngeal swabs, 28 feces, 13 cerebrospinal fluid, 5 bloods, 4 urines and one bronchoalveolar lavage). Enteroviruses were isolated in 48 patients (47%), corresponding to 60 clinical samples (62.5%). The enteroviruses were isolated in 75.5% of pharyngeal swabs, 71.4% of feces, 30.7% of cerebrospinal fluid, one blood (20%) and the bronchoalveolar lavage. 28 patients presented simultaneously both pharyngeal and rectal swabs; in this group the use of both samples permitted the isolation of Enteroviruses in 26 cases (92.8%). Of 60 Enteroviruses, 59 (98.3%) were isolated in the MRC-5 cell line, 23 (38.3%) in the Hep-2, and 14 (23.3%) in the Vero; the MRC-5 demonstrated a significant difference in the isolation of Enteroviruses compared with the other cell lines. The Enteroviruses were identified as 30 (50%) ECHO-virus, 15 (25%) as Poliovirus vaccine, 12 (20%) could not be identified and in 3 cases (5%) no growth of virus was

Correspondencia: Dr. J. Reina.
Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica.
Hospital Universitario Son Dureta.
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca.
Correo electrónico: jreina@hds.es

Manuscrito recibido el 13-9-1999; aceptado el 12-1-2000.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2000; 18: 116-119.

detected in the culture. The MRC-5 cell line was significantly superior to the other in the isolation of the different Enteroviruses.

CONCLUSIONS: To obtain the maximum diagnostic efficacy in front a patient with a possible infection by Enteroviruses, is necessary to use different clinical samples, specially the more related to the infection foci (cerebrospinal fluid or blood). The MRC-5 cell line has been the most efficace in the isolation of Enteroviruses independently of the type of clinical sample or the viral genus. The shell-vial assay is a good method for the isolation and identification of Enteroviruses isolated from clinical samples.

Key words: Enteroviruses. Clinical samples. Cellular lines. Shell-vial assay.

Introducción

Los Enterovirus son un grupo de virus ampliamente ubicuo que forma parte del medio ambiente y afecta al ser humano. Se los ha implicado en una gran cantidad de enfermedades humanas, aunque muchas de ellas son difíciles de demostrar de una forma definitiva^{1,2}.

Los Enterovirus son uno de los principales agentes etiológicos de los síndromes febriles sin focalidad de los lactantes y neonatos, así como de las enfermedades neurológicas (meningitis aséptica) y neuromusculares de la edad infantil^{1,3-5}. La inexistencia de casos agresivos de poliomielitis no ha disminuido la prevalencia de otros Enterovirus en el ecosistema humano, encontrándose en este momento un mayor número de enfermedades asociadas a la vacuna (Poliovirus vacunal), como parálisis flácidas^{1,2}.

Debido al ciclo biológico de los Enterovirus, estos virus penetran por vía oral, donde pueden ser detectados durante largos períodos, y se excretan de forma muy prolongada en heces. Por este motivo, los aislamientos realizados en estas muestras clínicas son muy difíciles de valorar en cuanto a su significación clínica^{1,2}. El aislamiento de Enterovirus en muestras estériles como el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre pone de manifiesto una mayor significación clínica, aunque con una menor sensibilidad^{6,7}.

Otro problema de los Enterovirus es la inexistencia de una línea celular única que permita aislar la totalidad de los virus. Esto obliga al empleo de varias líneas celulares sin que exista una recomendación definitiva sobre cuál/es son las más óptimas para ello^{1,2,6}.

Debido a todo ello hemos realizado un estudio prospectivo sobre la eficacia de diferentes muestras clínicas y líneas celulares en el aislamiento de Enterovirus en la población pediátrica.

Material y métodos

Se ha realizado un estudio prospectivo (de julio de 1997 a julio de 1999) sobre la utilidad de diferentes muestras clínicas y líneas celulares en el aislamiento de Enterovirus de pacientes pediátricos (lactantes de < 2 años de edad) con un síndrome febril de etiología desconocida. Las principales muestras analizadas fueron: heces y/o frotis rectales, frotis faríngeos, sangre, orina y lavado broncoalveolar.

Las muestras altamente contaminadas, como las heces y los frotis faríngeos, fueron descontaminadas previamente por mantenimiento

TABLA 1. Resultados obtenidos en las muestras analizadas

Tipo de muestra	Cultivo		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Frotis faríngeo	11	34	45 (46,8)
Heces	8	20	28 (29,1)
LCR	9	4	13 (13,5)
Sangre	4	1	5 (5,2)
Orina	4	0	4 (4,1)
LBA	0	1	1 (1,0)
Total	36 (37,5)	60 (62,5)	96

LBA: lavado broncoalveolar; LCR: líquido cefalorraquídeo.

en un medio de descontaminación con antibióticos. La sangre completa con EDTA o heparina fue fraccionada utilizando el compuesto polimérico Limphoprep®, que permite la separación de la fracción con predominio de los linfocitos-monocitos; esta fracción fue lavada dos veces con tampón fosfato salino (pH 7,2) y posteriormente centrifugada hasta resuspenderse en 1 ml de MEM (minimum essential medium).

Tras el proceso de descontaminación, homogeneización y fraccionamiento, las muestras fueron sembradas a razón de 250-300 µl en 3 viales de las diferentes líneas celulares a evaluar. Se han utilizado las líneas celulares MRC-5, Hep-2 y Vero en forma de shell-vial (Vircell, Granada). Tras su centrifugación (3.500 rpm/15 min), adsorción y cambio de medio, los viales fueron incubados durante 3 días a 36 °C. Transcurrido este período fueron fijados con metanol y/o acetona y revelados con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP1 del género Enterovirus (clon 5-D8/1, Dako Diagnóstica, Barcelona).

Los Enterovirus aislados fueron posteriormente identificados en cuanto a su género como Poliovirus vacunal, ECHO-virus o Coxsackie B mediante resiembra en la línea celular de mejor crecimiento y posterior revelado mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos (Poliovirus 1, 2 y 3; ECHO-virus 4, 6, 9, 11, 30 y 34; Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5 y B6) (Chemicon, CornMedica S.A., Barcelona). Las cepas no fueron subtipificadas tras la identificación del género.

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de la χ^2 y la determinación de la t de Student para los datos apareados. Todos los valores de p fueron bilaterales y se ha considerado como significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Durante el período de estudio se han analizado 102 lactantes con un síndrome febril (> 39 °C) sin focalidad aparente y no pertenecientes a ningún brote epidémico (casos comunitarios esporádicos). De éstos, en 54 (53%) no se aisló ningún Enterovirus y en 48 (47%) se aisló algún Enterovirus. En estos 48 pacientes se estudiaron 96 muestras: 45 frotis faríngeos (46,8%); 28 heces y/o frotis rectales (29,1%), 13 en LCR (13,5%), 5 en sangre (5,2%), 4 en orina (4,1%) y uno en lavado broncoalveolar (1%).

Se aisló algún Enterovirus en 60 muestras (62,5%), siendo las 36 restantes (37,5%) negativas para estos virus. Según el tipo de muestra se aislaron Enterovirus en 34 frotis faríngeos (75,5%), 20 heces (71,4%), 4 LCR (30,7%), uno en sangre (20%) y uno en lavado broncoalveolar (tabla 1). En 28 pacientes se disponía como mínimo, y simultáneamente para su estudio, de una muestra de heces y un frotis faríngeo, siendo ambas muestras positivas en 11 casos (39,2%), sólo positivas las heces en 9 casos (32,1%), sólo positivo el frotis faríngeo en 6 casos (21,4%) y ambas negativas en 2 casos (7,1%). Las heces

TABLA 2. Distribución de los Enterovirus aislados entre los pacientes estudiados

Virus	Cepas n.º (%)	Pacientes n.º (%)
ECHO-virus	30 (50)	22 (45,8)
Poliovirus	15 (25)	11 (22,9)
No tipificado	12 (20)	12 (25,0)
No crecido	3 (5)	3 (6,2)
Total	60	48

tras (71,4%) frente a 17 casos del frotis faríngeo (60,7%) ($p = 0,14$). El empleo simultáneo de ambas muestras permitió el diagnóstico en 26 casos (92,8%).

Los Enterovirus fueron aislados en las diferentes líneas celulares del siguiente modo: 59 cepas en la línea celular MRC-5 (98,3%), 23 cepas en la línea Hep-2 (38,3%) y 14 cepas en la línea Vero (23,3%). La línea MRC-5 ha demostrado una diferencia estadísticamente significativa al compararla con las otras dos líneas celulares ($p = 0,001$), observándose también una diferencia estadística entre los aislamientos obtenidos en la línea Hep-2 y Vero ($p = 0,032$).

Los 34 Enterovirus procedentes de los frotis faríngeos fueron aislados del siguiente modo: 33 en MRC-5 (97%), 14 en Hep-2 (41,1%) y 8 en Vero (23,5%). La línea MRC-5 ha resultado ser significativamente superior al resto de las comparadas para este tipo de muestra ($p < 0,001$). Los 20 Enterovirus procedentes de las heces se aislaron del siguiente modo: 20 en MRC-5 (100%), 9 en Hep-2 (45%) y 6 en Vero (30%). De nuevo la línea MRC-5 ha sido significativamente superior al resto ($p < 0,001$).

De los 60 Enterovirus aislados, 30 (50%) fueron identificados como ECHO-virus, 15 (25%) como Poliovirus vacunal, 12 (20%) no fueron tipificados y se clasificaron como Enterovirus y en 3 casos (5%) no se pudo realizar la tipificación por pérdida de la cepa. La distribución de los diferentes Enterovirus entre los pacientes se presenta en la tabla 2.

Los 30 ECHO-virus fueron aislados en 29 casos en la línea MRC-5 (96,6%), en 19 casos en la Hep-2 (63,3%) y ningún caso en la Vero. Los 15 Poliovirus vacunales fueron aislados en 15 casos en la línea MRC-5 (100%), 14 en la Hep-2 (93,3%) y 13 en la Vero (86,6%). La línea celular MRC-5 ha resultado ser más eficaz en el aislamiento de ECHO-virus, con significación estadística ($p = 0,01$), aunque igual a la Vero en el aislamiento de los Poliovirus vacunales ($p < 0,5$).

Discusión

De los diferentes cuadros clínicos causados por los Enterovirus, un gran número se presentan sin una focalidad evidente y su manifestación predominante es simplemente un síndrome febril de $> 39^{\circ}\text{C}$, con o sin signos de afectación del sistema nervioso central^{4,5,8,9}. Este tipo de presentación clínica es la que hemos estudiado prospectivamente en un intento de conocer la utilidad (rendimiento diagnóstico) de las diferentes muestras clínicas y la eficacia (capacidad de aislamiento) de diferentes líneas celulares.

Las muestras clínicas recomendadas para el aislamiento de los Enterovirus son principalmente aquellas más relacionadas con la sintomatología predominante, de modo que su aislamiento en ellas (LCR o sangre) nos aportaría un diagnóstico de seguridad. Por otro lado, el aislamiento en muestras no relacionadas directamente con la clínica (heces o frotis faríngeo) nos aportaría un diagnóstico de probabilidad, aunque siempre deben tenerse presentes los estados de excreción asintomática existentes, tanto en los niños sanos vacunados como en los infectados, lo que dificulta la valoración de los resultados obtenidos¹.

En nuestro estudio sólo hemos analizado el rendimiento diagnóstico de diferentes muestras clínicas, sin valorar su significación clínica. Así, se ha podido comprobar cómo el frotis faríngeo y las heces han sido las mejores muestras capaces de detectar la presencia de Enterovirus con un rendimiento superior al 70%. La mayoría de los estudios han demostrado una mayor eficacia de las heces, con porcentajes de positividad situados entre el 80-100%^{2,5}; sin embargo en nuestro caso y debido al aislamiento de un gran número de Poliovirus vacunales en los frotis faríngeos, esta muestra ha presentado un mayor porcentaje de positividad. Sin embargo, al analizar aquellos niños que disponían de forma simultánea de ambas muestras, se observa cómo son las heces (71,4%) las muestras de mayor eficacia diagnóstica. La utilización de varias muestras incrementa de forma significativa la capacidad diagnóstica de las mismas. Así, en el estudio de Dagan et al⁵, el empleo simultáneo de las heces y el frotis faríngeo comportaba un porcentaje de positividad del 90%, valor muy parecido al observado por nosotros (92,8%).

El LCR es la muestra recomendada para el diagnóstico de la meningitis por Enterovirus; sin embargo, su rendimiento diagnóstico mediante el empleo del cultivo celular dista bastante de ser el óptimo^{2,6,10}. En nuestro caso, esta muestra fue positiva en sólo 4 niños (30,7%), en uno de ellos conjuntamente con el frotis faríngeo y las heces, en otro con negatividad en ambas muestras y en dos casos sólo se remitió esta muestra. El porcentaje de positividad por cultivo del LCR es bastante variable, pues depende del contexto epidemiológico, brote de meningitis o caso esporádico, y del tipo de cultivo y líneas celulares que se utilicen. Los últimos estudios realizados en nuestro país ponen de manifiesto unos porcentajes de aislamiento de Enterovirus en LCR que oscilan entre el 8,7 y el 35,5%, porcentajes que ascienden si se consideran sólo las muestras con pleocitosis¹¹⁻¹³. A pesar de ello, parece evidente la necesidad de utilizar métodos moleculares (PCR) para la obtención del máximo rendimiento diagnóstico de esta muestra^{6,10,13}.

La utilización de la sangre periférica para el aislamiento de Enterovirus se recomienda en aquellos niños con un síndrome febril sin focalidad que se presentan preferentemente en el verano^{4,7}. La eficacia diagnóstica de esta muestra es, así mismo, variable (positividad del 30-60%) dependiendo de la clínica, edad y técnicas virológicas^{5,7}. En nuestro estudio, el 20% de las sangres estudiadas fueron positivas para Enterovirus, aunque su significación debe ser tomada con precaución debido al escaso número de sangres analizadas.

En general, los Enterovirus no presentan una excesiva dificultad para crecer en los cultivos celulares; sin embargo, debido a la diversidad de los mismos no existe una única línea celular que permita y asegure el aislamiento de todos ellos^{2,6,8}. Por ello, la mayoría de autores recomiendan la utilización de varias líneas celulares para obtener el máximo rendimiento en el aislamiento vírico. Entre las diferentes líneas celulares existentes, sería recomendable utilizar una primaria de riñón de mono (PMK), una continua tipo BGM, RD o Hep-2 (Cincinnati) y otra semicontinua de tipo fibroblástico (MRC-5), aunque las dificultades para la obtención y mantenimiento de las líneas primarias no permiten su utilización rutinaria¹⁴.

En nuestro estudio hemos analizado el rendimiento de tres de las líneas celulares utilizadas rutinariamente en nuestro laboratorio para el aislamiento de virus, MRC-5, Hep-2 y Vero. Hemos utilizando el método de shell-vial a pesar de que en algunos estudios se demuestra una sensibilidad algo inferior (57-93%) sobre el cultivo convencional en tubo^{15,16}; sin embargo, presenta una mayor especificidad (100%) al utilizar un anticuerpo monoclonal frente a la VP1 del cápside (clon 5-D8/1) y una mayor rapidez diagnóstica (2-3 días)^{16,17}.

Al igual que otros estudios previos^{2,6,11}, la línea celular MRC-5 ha resultado ser significativamente superior al resto de las estudiadas, tanto globalmente como en particular para cada tipo de muestra. Sólo en un caso el Enterovirus creció en la línea celular Hep-2 y no en la MRC-5. Al analizar la línea celular en función del Enterovirus aislado se observa que sólo la mayoría de los Poliovirus vacunales crecieron en las tres líneas celulares, mientras que los ECHO-virus lo hicieron preferentemente en la MRC-5 (96,6%) y no en la línea Vero. Por tanto, a la hora de recomendar una línea celular de máximo rendimiento, coincidimos con Rubio et al¹¹ en la elevada eficacia de la línea MRC-5 frente a las otras líneas estudiadas.

De los 60 Enterovirus aislados en este estudio, un 20% (12 cepas) no pudieron ser tipificadas con los antisueros comerciales utilizados, lo que apoya la necesidad de emplear sueros de mejor calidad y de remitir las cepas a un centro de referencia. Los reactivos utilizados por nosotros están formados por una mezcla de varios anticuerpos dirigidos contra los serotipos más frecuentes en cada género, de modo que existe la posibilidad de que las cepas no tipificables pudieran pertenecer a alguno de los no prevalentes. De los Enterovirus tipificados, el 50% correspondieron a ECHO-virus, incluidos los 4 aislamientos de LCR y sangre, y un 25% a Poliovirus vacunales, aislados preferentemente de heces y frotis faríngeos. La cepa aislada de sangre fue un Echovirus al igual que la aislada del lavado broncoalveolar.

En resumen, parece demostrada la necesidad de utilizar varias muestras clínicas, y las procedentes del

foco clínico deberían ser siempre las recomendadas. De las diferentes líneas celulares a utilizar para el aislamiento de Enterovirus, parece que la de tipo fibroblasto (MRC-5) es la que permite un mayor porcentaje de aislamientos, por lo que sería más aconsejable. El método shell-vial aplicado a esta línea nos parece eficaz en aquellos laboratorios que, por sus propias circunstancias, no puedan mantener los cultivos celulares convencionales en tubo.

Bibliografía

1. Cherry JD. Enteroviruses: Coxsackieviruses, Echoviruses and Polioviruses. En: Feigin RD, Cherry JD, editores. Textbook of pediatric infectious diseases (4.ª ed.). Filadelfia: WB Saunders Co., 1998; 1787-1839.
2. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and newer enteroviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. Fields Virology (3.ª ed.). Filadelfia: Lippincott-Raven, 1996; 655-712.
3. Jenista JA, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr* 1984; 104: 685-690.
4. Dagan R. Nonpolio enteroviruses and the febrile young infant: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 67-71.
5. Dagan R, Menegus MA. Nonpolio enteroviruses and the febrile infant. En: Rotbart HA, editor. Human enterovirus infections. Washington: American Society for Microbiology, 1995; 239-254.
6. Rotbart HA, Romero JR. Laboratory diagnosis of enteroviral infections. En: Rotbart HA, editor. Washington: American Society for Microbiology, 1995; 401-418.
7. Prather SL, Dagan R, Jenista JA, Menegus MA. The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. *J Med Virol* 1984; 14: 221-227.
8. Leggiadro RJ, Darras BT. Viral and bacterial pathogens of suspected sepsis in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 1983; 2: 287-289.
9. Dagan R, Hall CB, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology and laboratory diagnosis of infection with viral and bacterial pathogens in infants hospitalized for suspected sepsis. *J Pediatr* 1989; 115: 351-356.
10. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-981.
11. Rubio G, Mintegui S, Gaztelurrutia L, Sánchez J. Meningitis por enterovirus en pediatría. Características clínicas y diagnóstico virológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16: 14-18.
12. Valdezate S, Mesa F, Otero JR. Meningitis por enterovirus en un hospital pediátrico: experiencia en 1996. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16: 135-137.
13. Pena MJ, Bolaños M, Pérez MC, Mosquera MM, Trallero G, Lafarga B. Importancia de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central por enterovirus en la población pediátrica. Características clinicoepidemiológicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 227-230.
14. Johnston SL, Siegel CS. Presumptive identification of enterovirus with RD, Hep-2 and RMK cell lines. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1049-1050.
15. Klespies SL, Cebula DE, Kelley CL, Galehouse D, Maurer CC. Detection of enteroviruses from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1465-1467.
16. Van Doornum GJJ, De Jong JC. Rapid shell-vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2865-2868.
17. Trabelsi A, Grattard F, Nejmeddine M, Aouni M, Bourlet T, Pozzetto B. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2454-2457.