

Otimização e avaliação do ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando sangue colhido em papel de filtro

Standardization of the indirect immunofluorescence assay to search for human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies using blood collected on filter paper

RIALA6/1106

Joyce Matie Kinoshita SILVA¹, Mariana Cavalheiro MAGRI¹, Fabrício JACOB¹, Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA¹, Adele CATERINO-DE-ARAÚJO^{1*}

*Endereço para correspondência: Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP 01246-902, São Paulo, S.P. e-mail: caterino@ial.sp.gov.br

Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

Recebido: 17/01/2007 – Aceito para publicação: 25/04/2007

RESUMO

O presente trabalho objetivou a otimização e a avaliação da coleta de sangue em papel de filtro para ser usada em levantamentos soroepidemiológicos de infecção por herpesvírus humano 8 (HHV-8). Foram utilizados os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) LANA e Lítico para a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 em amostras de sangue colhidas em membrana Schleicher Schuell de 28 pacientes com sarcoma de Kaposi (SK)/AIDS e 10 indivíduos sadios sem SK, dos quais os soros haviam sido anteriormente usados na padronização destas técnicas. Lâminas contendo células da linhagem BCBL-1 estimuladas ou não com éster de forbol, eluatos de sangue e conjugado anti-imunoglobulina humana marcado com fluoresceína foram empregados nas reações sorológicas e, as reações e os critérios de positividade seguiram os previamente estabelecidos na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Foi detectada fluorescência verde-amarelada na maioria das células nas diluições 1:50 e 1:100. Isto dificultou a leitura da IFI-Lítico, principalmente em diluições baixas, mas não interferiu na IFI-LANA cujo padrão pontilhado no núcleo coexistiu com a fluorescência de membrana. À medida que se seguiram as diluições, houve desaparecimento da inespecificidade e a leitura prosseguiu normalmente. Houve concordância de resultados positivos e negativos, com diferenças mínimas nos títulos de anticorpos. Os resultados obtidos viabilizam a coleta de sangue em papel para estudos epidemiológicos de infecção por HHV-8.

Palavras-chave. sorologia, papel de filtro, imunofluorescência, herpesvírus humano 8 (HHV-8).

ABSTRACT

The aim of the present study was to standardize the use of blood collected on filter paper in seroepidemiological studies of human herpesvirus 8 (HHV-8) infection. HHV-8 latent and lytic antibodies were searched in eluates of blood collected on Schleicher Schuell membrane from 28 KS/AIDS patients and 10 health individuals without KS, using “in house” immunofluorescence assays (IFAs). Serum samples from the same individuals were previously evaluated by IFA-LANA and IFA-lytic, and the results were compared to the results obtained in this study. IFAs were conducted according to criteria established at Immunology Department of Instituto Adolfo Lutz, using BCBL-1 cells line stimulated or not with phorbol ester, and FITC-anti human IgG conjugate. Non-specific staining on IFAs were detected when 1:50 and 1:100 blood eluated dilutions were employed. This unespecificity disappeared on subsequent blood dilutions. Concordant positive and negative results were obtained between sera and blood samples, but some minor differences were observed on antibodies title. The results obtained confirmed the use of blood collected on paper filter for HHV-8 seroepidemiological purposes.

Key words. serology, paper filter, immunofluorescence assay (IFA), human herpesvirus 8 (HHV-8).

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do herpesvírus humano 8 (HHV-8)¹ como sendo o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), vários estudos se seguiram com vistas a identificar populações e regiões endêmicas desta virose². Inicialmente, homens que faziam sexo com homens HIV-soropositivos foram apontados como transmissores do HHV-8, pois neles foi detectada a forma epidêmica do SK associada à AIDS³⁻⁵. Posteriormente, o vírus foi encontrado nas outras formas clínico-epidemiológicas do SK: no SK clássico do mediterrâneo, no SK endêmico africano e no SK iatrogênico associado à terapia imunossupressora e corticosteróide^{2,6-8}.

Com a introdução da sorologia para a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 foi possível mapear populações e regiões endêmicas do vírus que estavam associadas ou não à presença de SK⁹. Curiosamente, ameríndios da Amazônia brasileira foram apontados como portadores de HHV-8, e neles não foi detectado o SK¹⁰. Da mesma forma, em alguns países africanos onde o HHV-8 é endêmico, não há muitos casos de SK. Isto leva a crer que existam fatores presentes no hospedeiro e/ou parasita que podem estar associados ao risco de desenvolver doença relacionada ao HHV-8¹¹.

Até o presente, não existe um consenso de qual o melhor método sorológico para o diagnóstico de infecção por HHV-8, porém devido ao alto custo dos “kits” disponíveis no mercado, as técnicas “in house” continuam sendo as mais utilizadas em levantamentos epidemiológicos¹²⁻¹⁴. A Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, introduziu no ano de 2001, a técnica de IFI-LANA e IFI-Lítico¹⁵ e com ela realizou uma série de estudos com populações de diferentes categorias de risco para adquirir esta virose. Foram analisados soros de indivíduos saudáveis e infectados pelo HIV/AIDS¹⁶, pacientes com SK/AIDS¹⁷, profissionais saudáveis da área da saúde¹⁷, indivíduos com deficiência física e mental¹⁷, mulheres portadoras do HIV/AIDS¹⁸, crianças nascidas de mães HIV-soropositivas¹⁹, crianças hospitalizadas para tratamento eletivo²⁰, populações indígenas²¹, pacientes em diálise²² e, finalmente, profissionais do sexo feminino²³.

Mais recentemente, com vistas a auxiliar países africanos com poucos recursos financeiros e que têm o SK na sua forma endêmica e epidêmica foi idealizado um estudo para verificar a possibilidade de utilizar sangue colhido em papel de filtro para a detecção de anticorpos anti-HHV-8. As vantagens deste procedimento são: facilidade de coleta, armazenamento, transporte, baixo custo e menor desconforto e risco para o paciente. Com base na Portaria do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT No 523) de 16/08/2005 que prevê apoio financeiro para intercâmbio técnico-científico entre Brasil e países africanos de língua portuguesa, foi encaminhado ao CNPq e aprovada a Missão Exploratória ProÁfrica, que visa detectar a real magnitude da infecção por HHV-8 em Moçambique. A etapa preliminar desta pesquisa é verificar a viabilidade da coleta de sangue em papel de filtro, objeto deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-HHV-8 em amostras de sangue colhidas em papel de filtro (membrana Schleicher Schuell BioScience Inc., USA) de 28 pacientes com SK/AIDS do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e 10 amostras de sangue de indivíduos aparentemente saudáveis, sem SK, colhidas no ano de 1999 e armazenadas a -70 °C. Soros dos mesmos indivíduos foram usados anteriormente na padronização da IFI-LANA e IFI-Lítico¹⁵ e os resultados obtidos comparados aos atuais. Células da linhagem BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 e, as mesmas células estimuladas com éster de forbol, foram usadas para a detecção dos anticorpos LANA e Lítico, respectivamente. As reações e os critérios de positividade seguiram os previamente estabelecidos na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, sendo considerados positivos na IFI-LANA os soros que a partir da diluição 1:50 apresentaram fluorescência verde maçã com padrão nuclear pontilhado em mais de 90% das células BCBL-1, e na IFI-Lítico, fluorescência intensa de membrana (nuclear e externa) e difusa em toda a célula, em aproximadamente 5% das células BCBL-1 estimuladas com éster de forbol^{15,17}.

Para a pesquisa atual, círculos de 6 mm de diâmetro contendo 10µL de sangue, ou seja 5µL de soro, foram recortados do papel e eluídos em 200µL de PBS 0,01M, pH 7,2, por 16 horas a 4°C. Posteriormente, foi adicionado 50µL de PBS contendo leite desnatado a 5% (diluição final 1:50 em PBS leite 1%) e feita a diluição seriada na razão 2 para titulação dos anticorpos. Todos os casos foram inicialmente testados para as diluições 1:50, 1:100 e 1:200. Foi utilizado como conjugado anti-IgG humana marcada com fluoresceína diluído em azul de Evans-leite 1%. Quatro profissionais treinados, dois dos quais não estavam envolvidos no estudo anterior, realizaram a leitura das lâminas.

A utilização dos soros desta casuística para a padronização da sorologia para HHV-8 na Seção de Imunologia do IAL foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas, incluindo a coleta de sangue em papel de filtro (CTC # 35/1999).

RESULTADOS

Durante o processo de padronização das técnicas de IFI-LANA e IFI-Lítico para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 nos anos de 1999-2000, foi verificado que o uso de leite desnatado a 1% bloqueava sítios inespecíficos de anticorpos e, assim, o leite foi usado nas várias etapas de reação, também para eluatos de papel de filtro.

Os resultados obtidos com eluatos tanto do grupo de pacientes com SK/AIDS como do grupo sadio mostraram fluorescência verde-amarelada na maioria das células BCBL-

1 nas diluições 1:50 e 1:100. Isto dificultou a leitura principalmente da IFI-Lítico, mas não interferiu na IFI-LANA, cujo padrão pontilhado no núcleo coexistiu com a fluorescência de membrana (Figura 1, Painel A e B, respectivamente). À medida que se seguiram as diluições, houve desaparecimento da inespecificidade e a leitura prosseguiu normalmente (Figura 1, Painel D e E). Para os casos negativos e do grupo sadio, houve apenas padrão amarelado que desapareceu com a diluição do soro (Figura 1, Painel C e F).

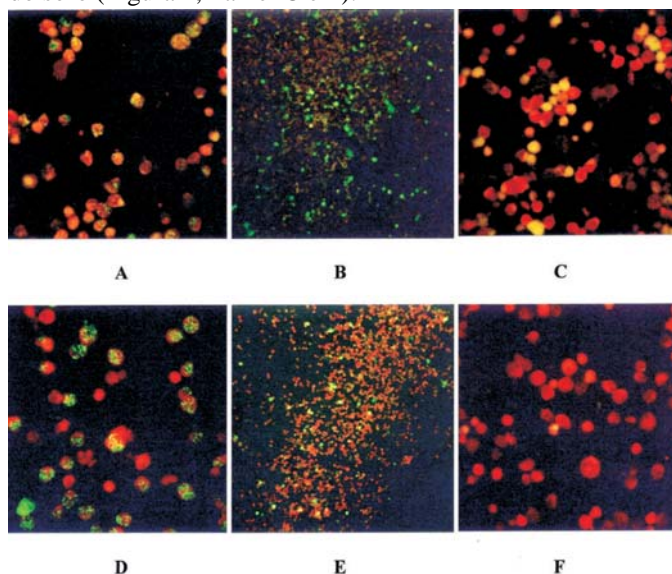


Figura 1. Amostras representativas do padrão de fluorescência obtido com as reações de IFI-LANA e IFI-Lítico, usando eluato de sangue colhido em papel de filtro de casos de SK/AIDS. Painel A e C (soro-reagente e não-reagente na IFI-LANA, diluição 1:50, aumento x400), Painel B (soro-reagente na IFI-Lítico, diluição 1:50, aumento x200). Painel D, E e F (mesmos soros na diluição 1:400).

Houve concordância de resultados positivos e negativos nos dois grupos analisados com diferenças nos títulos de anticorpos em oito casos de SK/AIDS: seis com diferença de um título (Pt. 10, 14, 28, 31, 34 e 39), um com diferença de dois títulos (Pt. 32) e um com diferença de três títulos (Pt. 38). Na maioria dos casos os títulos mais altos foram obtidos com eluato de sangue (Tabela 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos últimos anos, vários inquéritos soropidemiológicos principalmente de doenças parasitárias têm sido realizados usando sangue colhido em papel de filtro. Este material tem se mostrado útil para ser empregado em reações de aglutinação, imunoenzimáticas (ELISA), de imunodifusão (ID) e IFI. Um estudo comparativo usando soro e eluato de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* mostrou que o eluato poderia ser usado na pesquisa de toxoplasmose congênita,

Tabela 1. Resultados obtidos com a sorologia para HHV-8 usando soro e eluato de sangue colhido em papel de filtro de 28 pacientes com SK/AIDS.

PACIENTE No	SORO		ELUATO DE SANGUE	
	IFI-LANA*	IFI-LÍTICO*	IFI-LANA*	IFI-LÍTICO*
2	25.600	3.200	25.600	3.200
3	25.600	3.200	25.600	3.200
4	1.600	800	1.600	800
5	200	800	200	800
6	100	100	100	100
7	200	800	200	800
8	-	-	-	-
9	200	6.400	200	6.400
10	-	50	-	-
11	200	800	200	800
12	800	3.200	800	3.200
13	200	-	200	-
14	200	50	100	100
16	400	400	400	400
17	-	50	-	50
18	1600	25.600	1600	25.600
23	-	3200	-	3.200
26	-	-	-	-
28	800	800	1.600	1.600
31	25.600	3.200	51.200	6.400
32	100	400	400	800
34	1.600	200	1.600	400
35	6.400	1.600	6.400	1.600
37	-	-	-	-
38	1.600	1.600	3.200	200
39	25.600	3.200	25.600	1.600
48	-	-	-	-
50	-	-	-	-

* Título de anticorpos (recíproca da maior diluição do soro com resultado reagente).
- (soro não reagente)

reduzindo assim a necessidade de punção sanguínea em crianças e possibilitando o uso de material estocado em papel de filtro²⁴. Já no Programa de Controle do Calazar no Brasil, a Fundação Nacional de Saúde adotou o uso da coleta de sangue em papel para o controle da leishmaniose visceral canina, com vistas a introduzir um programa de eliminação de cães sororeativos. Nele foi feito um estudo comparativo entre soro e eluato, usando as técnicas de IFI e ELISA. Os resultados obtidos provaram ser o eluato de sangue útil para inquéritos soropidemiológicos²⁵. Na Nicarágua, um estudo em região endêmica de doença de Chagas mostrou que o uso de sangue colhido em papel de filtro poderia substituir o soro nas reações de ELISA e IFI, resultando em sensibilidade de 100% e especificidade de 90% para a pesquisa de anticorpos específicos²⁶. A mesma estratégia para pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* foi adotada para controle de malária na Amazônia brasileira²⁷ e na Índia²⁸. Recentemente, foi proposto pelo CDC de Atlanta nos EUA, um protocolo de extração de anticorpos de amostras de sangue

colhidas em papel, para serem utilizadas na sorologia para sarampo/rubéola pela Organização Mundial da Saúde, em situações de surtos²⁹.

Até o presente, não foram encontrados relatos de sorologia para HHV-8 usando sangue colhido em papel de filtro. O presente estudo mostra que esta prática pode ser adotada para pesquisa de anticorpos na IFI-LANA e IFI-Lítico e que os resultados obtidos são concordantes, embora com algumas diferenças no título de anticorpos. Estas diferenças podem estar relacionadas ao lote de células e lâminas empregadas na reação, à forma de armazenamento do soro/sangue e, finalmente, ao critério de leitura dos técnicos envolvidos na análise. Curiosamente, em alguns casos, o título de anticorpos detectado em material colhido em papel de filtro foi superior ao encontrado no soro. Isto pode ser devido ao processo de congelamento/descongelamento que os soros sofreram durante as várias etapas de padronização da IFI-LANA e IFI-Lítico, bem como na avaliação de kits comerciais de ELISA e IFI, realizados em anos anteriores¹⁷, fato que não ocorreu com o sangue colhido em papel de filtro.

Embora mais estudos sejam necessários para a validação do método, a facilidade de coleta, armazenamento, transporte, baixo custo e menor desconforto ao paciente permite a utilização desta metodologia em inquéritos epidemiológicos de infecção por HHV-8 e na Missão Exploratória ProÁfrica onde são parceiros o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, o Centro de Referência e Treinamento em AIDS de São Paulo e a Universidade Eduardo Mondlane de Maputo, Moçambique.

AGRADECIMENTOS

Suporte: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Edital Pró-África, Processo # 490179/2006-1.

Joyce M. K. SILVA (Bolsista do Programa de Aprimoramento da FUNDAP, área Imunologia no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo), Mariana C. MAGRI (Bolsista de Mestrado do CNPq e Pós-Graduanda do Curso de Farmácia, Área Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), Fabrício JACOB (Bolsista de Mestrado da CAPES e Pós-Graduando da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Área Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública), Elizabeth SANTOS-FORTUNA (PqC V, Supervisora FUNDAP), Adele CATERINO-DE-ARAUJO (PqC VI, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, Orientadora)

REFERÊNCIAS

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles J, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266: 1865-9.
2. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part. 1: epidemiology, environmental predispositions, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:281-92.
3. Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganen D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med* 1996; 2 (8): 918-24.
4. Martin JN, Ganen DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 1998; 338 (14): 948-54.
5. Grulich AE, Olsen SJ, Luo K, Hendry O, Cunningham P, Cooper DA. Kaposi's sarcoma -associated herpesvirus: a sexually transmissible infection? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 387-93.
6. Schultz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Gen Virol* 1998; 79: 1573-91.
7. Leão JC, Caterino-de-Araujo A, Porter SR, Scully C. Human Herpesvirus 8 (HHV-8) and the etiopathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Rev Hosp Clín Fac Med S. Paulo* 2002; 57 (4): 175-86.
8. Edelman DC. Human herpesvirus 8 - A novel pathogen. *Virol J* 2005; 2 (78): 1-91.
9. Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 175-85.
10. Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian amerindians: A hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 2000; 181: 1562-8.
11. Ablashi D, Chatlynne L, Cooper H, Thomas D, Yadav M, Norhanom AW et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa. *Br J Cancer* 1999; 81 (5): 893-7.
12. Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI et al. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. *J Infect Dis* 1998; 178: 304-9.
13. Edelman DC, Ketema F, Saville RD, Herman J, Sill AM, Gill PS et al. Specifics on the refinement and application of two serological assays for the detection of antibodies to HHV-8. *J Clin Virol* 2000; 16: 225-37.
14. Martin JN, Amad Z, Cossen C, Lam PK, Kedes DH, Page-Shafer KA et al. Use of epidemiologically well-defined subjects and existing immunofluorescence assays to calibrate a new enzyme immunoassay for human herpesvirus 8 antibodies. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 696-701.
15. Carbone PHL, Santos-Fortuna E, Moreira AA, Cibella SEL, Caterino-de-Araujo A. Padronização da técnica de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica na infecção

- pelo herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8). In: IV Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 2001. Resumos, *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60 (Supl. 1): 136.
16. Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1999; 179: 1591-2.
 17. Carbone PHL. Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, S.P.: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2003. 150 pp.
 18. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Carbone PHL, Cibella SEL, Moreira AA. Human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies among women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Brazilian J Infect Dis* 2003; 7 (6): 395-401.
 19. Caterino-de-Araujo A, Cibella SEL. Searching for antibodies to HHV-8 in children born to HIV-1 infected mothers from São Paulo, Brazil. Relationship to maternal infection. *J Trop Pediatr* 2003; 49 (4): 247-50.
 20. Avelleira JCR, Lupi O, Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E. Seroprevalence of HHV-8 infection in the pediatric population of two university hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Intern J Dermatol* 2006; 45: 381-3.
 21. Cunha AMG, Caterino-de-Araujo A, Costa SCB, Santos-Fortuna E, Boa-Sorte NCA, Gonçalves MS et al. Increasing seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol* 2005; 86 (9): 2433-7.
 22. Magri MC, Caterino-de-Araujo A. Pesquisa da prevalência de anticorpos anti-HHV-8 em pacientes em diálise e em fila de transplante renal. BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista [serial online] 2006 Dezembro; 3(36). Available from: URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa36_monografia.htm.
 23. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Magri MC, Schuelter-Trevisol F, Silva MV. Latent Human Herpesvirus – 8 (HHV-8) infection in female commercial sex workers from Imbituba, Santa Catarina, Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2007; 11(1): 9-11.
 24. Patel B, Holliman RE. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in eluates from filter paper specimens. *Br J Biomed Sci* 1994; 51(2): 104-8.
 25. Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and lower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31 (5): 419-24.
 26. Palácios X, Bellei A, Espino AM. Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in Somoto, Nicarágua, using indirect ELISA and IFI on blood samples on filter paper. *Rev Panam Salud Publica* 2000; 8 (6): 411-7.
 27. De Carvalho ME, Ferreira MU, De Souza MR, Ninomia RT, Matos GF, Camargo LM et al. Malaria seroepidemiology: comparison between indirect fluorescent antibody test and enzyme immunoassay using bloodspot eluates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 (2): 205-8.
 28. Biswas S. Inter-test comparison between filter paper absorbed blood eluate and serum for malaria serology by enzyme immunoassay: an operational feasibility. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25 (4): 399-410.
 29. Mercader S, Featherstone D, Bellini WJ. Comparison of available methods to eluate serum from dried blood spot samples for measles serology. *J Virol Methods* 2006; 137(1): 140-9.