

## **RIDASCREEN® EBV VCA**

Enzymimmunoassay zum Nachweis von  
Antikörpern (IgG, IgM) gegen Capsid Antigen von EBV

Enzyme immunoassay for the detection of  
antibodies (IgG, IgM) against capsid antigen of EBV

Art. No.: K 6721 (IgG)  
K 6731 (IgM)

In vitro Test  
Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C

Anschrift:

R-Biopharm GmbH  
Dolivostr. 10  
D-64293 Darmstadt

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0  
Sekretariat Marketing (0 61 51) 81 02-23

Telefax:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
Marketing (0 61 51) 81 02-40

RIDA® und RIDASCREEN®  
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm GmbH  
Hersteller: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland

RIDA® and RIDASCREEN®  
are registered trademarks of R-Biopharm GmbH  
Manufacturer: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Allgemeines.....	4
2. Einleitung.....	4
3. Testprinzip.....	5
4. Packungsinhalt.....	6
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör.....	7
6. Vorsichtsmaßnahmen.....	8
7. Reagenzien und ihre Lagerung.....	8
8. Anzeichen für Reagenzienverfall.....	9
9. Sammlung und Lagerung der Proben.....	9
10. Testdurchführung.....	9
11. Auswertung.....	12
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation.....	14

Contents

	page
1. Intended use.....	15
2. General.....	15
3. Test principle.....	16
4. Reagents provided.....	17
5. Materials required but not provided.....	18
6. Warnings and precautions for the users.....	19
7. Storage instructions.....	19
8. Indication of instability or deterioration of reagents.....	20
9. Specimen collection and storage.....	20
10. Test procedure.....	20
11. Analysis.....	23
12. Remarks about the test procedure and interpretation.....	25

Appendix

Literature.....	26
-----------------	----

## 1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® EBV VCA-Test ist ein Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Virales Capsid Antigen des Epstein-Barr-Virus (EBV) in humanem Serum.

## 2. Einleitung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zur Familie der  $\gamma$ -Herpesviren. Sein systematischer Name ist humanes Herpesvirus 4. Wie bei anderen Herpesviren besteht das Genom aus doppelsträngiger DNA. Diese befindet sich in einem umhüllten, ikosaedrischen Kapsid. Die Zielzellen des EBV sind humane B- und T-Lymphozyten. In ihnen vermehrt sich das Virus zunächst lytisch unter Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel. Danach geht das Virus in das für Herpesviren typische Latenzstadium über. In diesem Zustand verbleibt das Virus in einem Teil der B-Zellen. Zusätzlich zum Latenzstadium wird das Virus aber auch in geringen Mengen lebenslang über die Mundschleimhaut ausgeschieden.

Die Inkubationszeit beträgt ca. vier bis sechs Wochen. Bei Kindern verläuft die Infektion oft asymptomatisch. Bei Jugendlichen und Erwachsenen entwickelt sich nach der Inkubationszeit das klinische Bild einer infektiösen Mononukleose. Diese selbstlimitierende, oft aber Wochen dauernde Erkrankung ist auch als Pfeiffersches Drüsenfieber bekannt. Es kommt zu Halsschmerzen, Fieber und geschwollenen Lymphknoten. Tränende Augen sind eine häufige Begleiterscheinung. Weiterhin findet man nach zwei bis drei Wochen als häufiges Symptom eine Schwellung der Milz. Zudem werden bei einem Viertel der Patienten Hautausschläge beobachtet. In seltenen Fällen kann es zu einer chronisch-persistierenden Infektion kommen. In diesen Fällen geht bei anhaltender Symptomatik das Virus nur zu einem geringen Teil oder gar nicht in das Latenzstadium über. Die Vermehrung erfolgt weiterhin lytisch. Die Symptome bei diesem Verlauf sind Müdigkeit und Abgeschlagenheit sowie Lymphknotenschwellung, die aber schwächer ausgeprägt sind als im akuten Stadium der Mononukleose. Bei Immunsupprimierten besteht zudem die Gefahr der Entstehung eines B-Zell-Lymphoms. Organtransplantierte haben hierfür ein bis zu 5 % höheres Risiko, bei AIDS-Patienten liegt dieses Risiko sogar bei 60 %.

In ost- und südostasiatischen Ländern ist das EBV zudem für die Entstehung des Nasopharynxkarzinoms von Bedeutung. Mit 20 Erkrankungen pro 100.000 Personen pro Jahr ist dies die häufigste Tumorerkrankung in diesen Ländern.

Für die Diagnostik unterscheidet man Antikörper gegen verschiedene Virusproteine: Proteine der Virusreplikation (EA = early antigen), Strukturproteine (VCA = virus capsid antigen) und nukleäre Antigene (EBNA = Epstein-Barr nuclear antigens). IgM-, IgA- und IgG-Antikörper gegen das VCA sind mit Einsetzen der Symptome in aller Regel nachweisbar. IgM- und IgA-Antikörper sind nach wenigen Monaten nicht mehr nachweisbar und dienen somit als Marker für eine Primärinfektion. IgG-Antikörper gegen die Strukturproteine bleiben lebenslang erhalten.

IgM- und IgA-Antikörper gegen das Early Antigen sind ebenfalls frühzeitig nachweisbar und können zusätzlich als Marker für eine Primärinfektion dienen. Die Bildung von IgG gegen das EA setzt etwas verzögert ein. Zudem bleiben diese Antikörper im Gegensatz zu IgG-Antikörpern gegen VCA nicht lebenslang erhalten, sondern nehmen nach wenigen Monaten wieder ab. Nach drei bis sechs Monaten, mit dem Übergang des Virus in das Latenzstadium, setzt die Bildung von IgG-Antikörpern gegen nukleäre Antigene (EBNA) ein. Von Bedeutung sind hier besonders IgG-Antikörper gegen das EBNA1-Protein. Dieses anti-EBNA1-IgG dient als Marker für das Ende der akuten Infektionsphase und bleibt lebenslang erhalten. Bei Ausbleiben des Latenzstadiums (chronisch-persistierende Infektion) fehlen diese Antikörper. Zudem können sie bei Immunsuppression auch wieder abnehmen und verschwinden.

IgA-Antikörper sind für die Diagnostik des in Europa seltenen Nasopharynxkarzinoms von Bedeutung. Erhöhte Titer gegen diese Antikörper nach der akuten Infektionsphase können ein Hinweis auf die Entstehung eines Karzinoms sein. Bei rechtzeitiger Diagnose kann dieses Karzinom aber gut behandelt werden.

## 3. Testprinzip

An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind gereinigte, spezifische Capsid Antigene von EBV gebunden. In diese Vertiefungen werden verdünnte Patientenproben sowie die Kontrollen pipettiert und bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei binden vorhandene Antikörper an die immobilisierten Antigene. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt.

Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-human-Antikörpers (anti-IgG bzw. -IgM). Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB), das bei positiven Proben durch gebundenes Enzym zur Entwicklung einer blauen Farbe führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge  $\geq$  620 nm).

#### 4. Packungsinhalt

##### 4.1. RIDASCREEN® EBV VCA IgG (Art. No. K 6721)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.  
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;  
beschichtet mit Capsid Antigen von EBV  
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);  
Probenpuffer, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10fach konz.);  
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
- 1 x Standardkontrolle (2,5 ml);  
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml);  
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroG LD (12 ml);  
anti-*human-IgG*-Konjugat; gebrauchsfertig;  
Peroxidase-markierter Antikörper (Ziege)
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);  
1 N Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

##### 4.2. RIDASCREEN® EBV VCA IgM (Art. No. K 6731)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.  
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;  
beschichtet mit Capsid Antigen von EBV;  
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);  
Probenpuffer, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10fach konz.);  
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
- 1 x Standardkontrolle (2,5 ml);  
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml);  
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroM LD (12 ml);  
anti-*human-IgM*-Konjugat; gebrauchsfertig;  
Peroxidase-markierter Antikörper (Ziege)
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);  
1 N Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

#### 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

##### 5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

##### 5.2. Zubehör

- feuchte Kammer bei 37 °C
- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl Volumina
- Meßzylinder (1000 ml)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Standardkontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HBsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Standardkontrolle und Negativkontrolle, sowie der Probenpuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,01 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Der Waschpuffer enthält 0,2 % Bronidox-L als Konservierungsmittel. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch der Kontrollseren zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der verdünnte Waschpuffer (RIDASCREEN® SeroWP) ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluß nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine Kontamination des Substrates (RIDASCREEN® SeroSC) mit der Konjugatlösung ist unbedingt zu vermeiden, da diese eine Verfärbung des Substrates zur Folge hat. Ebenso ist eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativkontrolle bei 450/620 nm > 0,3
- ein Extinktionswert des Standardkontrollserums bei 450/620 nm außerhalb des im beigefügten Auswertblatt angegebenen Wertebereichs.

## 9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDASCREEN® EBV VCA EIA ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich.

Serumverdünnungen sind nicht länger als 7 Stunden bei 2 - 8 °C haltbar.

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Allgemeines

Einzelne der im vorliegenden Test verwendeten Reagenzien sind nicht kitspezifisch. Diese mit RIDASCREEN® Sero bezeichneten Reagenzien (SeroWP, SeroPP, SeroG LD, SeroM LD, SeroSC, SeroStopp) können auch bei anderen RIDASCREEN® EIAs mit entsprechend deklarierten Reagenzien verwendet werden. Dies gilt nicht für die chargenspezifischen Kontrollseren.

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab. Eine Abweichung von den vorgegebenen Inkubationszeiten und Temperaturen führt zu einer übermäßigen Differenz der Standardkontrolle zum vorgegebenen Sollwert, welche nicht mehr von dem ermittelten Wertebereich abgedeckt wird.

Während des Waschens ist darauf zu achten, daß alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und daß zwischen den Waschschrritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschrritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.

Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.  
Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

#### 10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Puffer-Konzentrates (RIDASCREEN® SeroWP) wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Hierfür werden 100 ml des Puffer-Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Puffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

#### 10.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer (RIDASCREEN® SeroPP) 1:100 verdünnt.

Verdünnung der Serumproben (IgG- und IgM-Bestimmung):

z. B. 10 µl Serum + 990 µl Probenpuffer

Für IgM-Bestimmungen sollten Seren vor der Testung einer IgG-Adsorption (z. B. mit dem RIDA® G-Adsorbens, Art. No. Z 0101 / Z 0102) unterzogen und erst danach mit dem Probenpuffer auf die jeweilige Endverdünnung gebracht werden.

#### **Achtung!**

**Negativkontrolle und Standardkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt oder adsorbiert werden.**

#### 10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, die Position A1 (Reagenzienleerwert) bleibt frei. Die Negativkontrolle wird einfach und die Standardkontrolle doppelt mitgeführt. Die Platte wird 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei sollte der Boden der Kavitäten keinen Kontakt zu gut wärmeleitenden Materialien (Metall oder feuchtes Papier) haben.

Die der Bestimmung (IgG bzw. IgM) entsprechenden Kontrollen sind zu verwenden

A1	Reagenzienleerwert
B1	Negativkontrolle
C1	Standardkontrolle
D1	Standardkontrolle
E1, F1	Patientenserum 1, 2, usw.

#### **Achtung!**

**Die ELISA-Platte darf nicht in ein kühles Inkubationsbehältnis gestellt werden, das sich erst während der Inkubation auf 37 °C erwärmt. Das Behältnis muß schon vorab an 37 °C adaptiert sein.**

#### 10.5. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 4mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

**Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten.**

#### 10.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroG LD bzw. SeroM LD (Anti-human-IgG- bzw. Anti-human-IgM-Konjugat) in die entsprechenden Vertiefungen (einschließlich A1). Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

#### 10.7. Waschen

4maliges Waschen gemäß Pkt. 10.5.

#### 10.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroSC in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen den Reagenzienleerwert (Position A1).

#### **Achtung:**

**Zur Entfernung von Kondenswasser muß die Unterseite der Mikrotiterplatte vor der Messung abgewischt werden.**

## Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des RIDASCREEN® SeroWP
3. Herstellung der Serumverdünnungen
4. Pipettieren von 100 µl Standardkontrolle und Negativkontrolle bzw. Probe in die Mikrotiterstreifen; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
6. Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroG LD bzw. SeroM LD; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
7. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
8. Zugabe von je 100 µl RIDASCREEN® SeroSC; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
9. Nach Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp photometrische Auswertung bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm)

## 11. Auswertung

Die Auswertung des Tests kann auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt werden:

1. über die beiliegende Standardkurve
2. über die Wertetabelle (siehe beiliegendes Datenblatt)
3. mathematisch nach der 4-Parameter-Auswertung oder der α-Methode

**Von allen Extinktionswerten muß vor der Auswertung der Reagenzienleerwert abgezogen werden.**

### 11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Standardkontrolle (Doppelbestimmung) und Negativkontrolle mitzuführen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle bei 450/620 nm in dem Wertebereich liegt, der auf dem beigefügten Datenblatt angegeben ist. Ist die Differenz beider Einzelmessungen größer 20 %, muß der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muß bei 450/620 nm einen Extinktionswert < 0,3 aufweisen sowie in der Bewertung negativ sein.

### 11.2. Auswertung über die Standardkurve

Um eine Auswertung mittels Standardkurve durchzuführen, muß zunächst über den Mittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) eine Korrektur der Tagesschwankung vorgenommen werden. Aus dem Sollwert der Standardkontrolle und dem aktuell gemessenen Wert der Kontrolle wird der Korrekturfaktor F berechnet. Der chargenabhängige Sollwert ist auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt.

$$F = \frac{\text{Sollwert der Standardkontrolle}}{\text{Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle}}$$

Mit dem Faktor F werden alle OD-Werte der Proben multipliziert. Mit diesen korrigierten Werten wird dann der entsprechende Unit-Wert in der Standardkurve abgelesen.

### 11.3. Auswertung über die Wertetabelle

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) bestimmt in der Wertetabelle die Spalte mit dem Wertebereich, der für die aktuelle Messung gültig ist. Innerhalb der Spalte wird der gemessene Extinktionswert der Probe dem passenden Extinktionsbereich zugeordnet und in der zweiten Spalte von links der entsprechende Titer in Units/ml abgelesen.

	Units/ml	Wertebereich der Standardkontrolle	
			0,87 - 0,92
-	< 10,0	< 0,33	
?	10,0 - 14,0	0,33 - 0,40	
+	14,1 - 35,0	0,41 - 0,72	
	35,1 - 80,0	0,73 - 1,14	
	80,1 - 150,0	1,15 - 1,50	
	150,1 - 300,0	1,51 - 1,84	
	300,1 - 1.000	1,85 - 2,34	
	> 1.000	> 2,34	

Abb. 1: Beispiel für eine IgG-Bestimmung  
(Auszug aus einem chargenspezifischen Datenblatt)

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle beträgt beispielsweise bei einer Messung 0,89. In diesem Fall ist für die Ermittlung des Ergebnisses die Spalte mit dem Bereich 0,87 bis 0,92 aus der Tabelle entscheidend. Eine Patientenprobe mit

einem Extinktionswert von 0,48 liegt dann einem Titer-Bereich von 14 bis 35 Units/ml. (Die genannten Werte sind als Beispiel zu sehen und können von den aktuellen Werten des Datenblattes abweichen.)

Die Bewertung des ermittelten Ergebnisses - positiv (+), negativ (-) oder grenzwertig (?) - ist der ersten Spalte der Wertetabelle zu entnehmen.

#### 11.4. Mathematische Auswertung

Die benötigten Werte für eine mathematische Auswertung nach der 4-Parameter-Auswertung oder der  $\alpha$ -Methode sind auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt. Bei Fragen zur Anpassung des EIAs an Laborgeräte sowie zur mathematischen Auswertung stehen wir Ihnen gerne jederzeit unter folgender Rufnummer zur Verfügung: 0 61 51 / 81 02-0.

#### 11.5. Testergebnis

Tab. 1: Bewertung der ermittelten Units

	IgG	IgM
negativ	< 10 U/ml	< 10 U/ml
grenzwertig	10 - 14 U/ml	10 - 13 U/ml
positiv	> 14 U/ml	> 13 U/ml

## 12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Der RIDASCREEN® EBV VCA EIA weist Antikörper gegen das Capsid Antigen von EBV nach. IgM-Antikörper gegen dieses Antigen dienen als frühzeitiger Hinweis auf eine akute Infektion. Ein Fehlen von IgM-Antikörpern bei gleichzeitig positivem IgG weist auf eine latente Infektion mit dem Virus hin. Zur Abklärung des Latenzstadiums sollte der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das nukleäre Antigen von EBV (RIDASCREEN® EBV EBNA, Art. No. K 6621) durchgeführt werden. Diese sind erst nach Übergang in das Latenzstadium vorhanden.

IgG-Antikörper gegen VCA treten im Verlauf der Erstinfektion etwas verzögert zum IgM auf. Sie steigen dann deutlich an und fallen nach Erreichen des Latenzstadiums wieder leicht ab. IgG-Titer gegen VCA bleiben lebenslang nachweisbar.

IgG-Antikörper gegen EBV findet man bei 95 % der Bevölkerung. Da das Virus nach überstandener akuter Infektion latent in einem Teil der B-Zellen verbleibt, können nach einer Stimulation des Immunsystems Antikörpertiter gegen das EBV wieder erhöht sein; dies betrifft auch die Bildung von IgM-Antikörpern. Deshalb sind die erzielten Ergebnisse immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren. Zur Verbesserung der diagnostischen Aussage sollten zwei aufeinander folgend entnommene Seren eines Patienten untersucht werden.

## RIDASCREEN® EBV VCA

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies (IgG, IgM) against capsid antigen of EBV

### 1. Intended use

The RIDASCREEN® EBV VCA test is an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of antibodies (IgG and IgM) against capsid antigen of Epstein-Barr virus (EBV) in human serum.

### 2. General

The Epstein-Barr virus (EBV) belongs to the family of  $\gamma$ -Herpes viruses. Its systematic name is Human Herpes virus 4. As with other Herpes viruses, the genome consists of double-stranded DNA. This is contained in an enclosed, icosahedric capsid. The target cells of the EBV are human B- and T-lymphocytes within which the virus initially reproduces itself lytically releasing new infectious virus particles at the same time. After this, the virus transforms into the latent stage typical for Herpes viruses. The virus remains in this state in some of the B cells. As well as changing into the latent stage, a small amount of the virus is excreted via the mucous membrane of the mouth throughout the life of the host.

The incubation time for the virus is approximately four to six weeks. In the case of children, the course of the infection often runs without any symptoms. For adolescents and adults, the virus develops the clinical symptoms of an infectious mononucleosis after the incubation period. This self-limiting disease, often lasting for weeks, is also known as Pfeiffer's disease or glandular fever. The symptoms are sore throat, fever and swollen lymph nodes which are often accompanied by watering eyes. After two or three weeks, another symptom which often appears is a swollen spleen and, in a quarter of patients, skin rashes. In rare cases, chronic permanent infection can develop and, while symptoms persist, the virus transforms into the latent stage to a small degree only or not at all. Furthermore,

multiplication occurs lytically. During this process the symptoms which appear are tiredness, exhaustion and swelling of the lymph nodes, but this is not as pronounced as it is during the acute stage of mononucleosis. In the case of patients with immune suppression, there is also the danger of a B-cell lymphoma. For organ transplant patients, the risk of this happening increases by up to 5% while in the case of AIDS patients this risk is as high as 60%.

In Eastern and South East Asia, EBV is also an important factor in the occurrence of nasopharyngeal carcinoma. At the rate of 20 cases per 100,000 each year, this is the most frequently occurring cancer in this region.

For the diagnosis, it is possible to distinguish between the ways in which the antibodies act against the different virus proteins: proteins from virus replication (EA = early antigen), structure proteins (VCA = virus capsid antigen) and nuclear antigens (EBNA = Epstein-Barr nuclear antigens). IgM, IgA and IgG antibodies acting against VCA are generally found as the symptoms start to occur. After a few months, IgM and IgA antibodies are no longer found and therefore serve as a marker for primary infection. IgG antibodies acting against the structure proteins remain for the rest of the patient's life. IgM and IgA antibodies acting against early antigens can also be detected early on and can also be used as a marker for primary infection. The formation of IgG antibodies acting against EA has a somewhat delayed start. Furthermore, in contrast to IgG antibodies acting against VCA, IgG antibodies acting against EA do not remain for the whole of the patient's life but deteriorate after a few months. After three to six months, with the transition of the virus into its latent stage, the formation of IgG antibodies against nuclear antigens starts to take place. Of importance are especially IgG antibodies against the EBNA1 protein. This anti-EBNA1 IgG serves as a marker for the end of the acute infection phase and remains in existence for the rest of the patient's life. By non-appearance the latent stage (chronic persistent infection), these antibodies are missing. In the case of patients with immune suppression, they may also decrease again and disappear altogether.

IgA antibodies are important for the diagnosis of nasopharynx carcinoma, which is rare in Europe. An increased titer against these antibodies after the acute infection phase is over may indicate the onset of a carcinoma. Timely diagnosis can then lead to its effective treatment.

### 3. Test principle

On the surface of the microtiter wells, purified capsid antigen of EBV are bound. Diluted serum samples and Controls are pipetted into the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. Present antibodies bind to the immobilized antigen. Unbound material is removed in a washing step.

In a second step, a peroxidase-conjugated anti-human antibody (anti-IgG or IgM) is added. After incubation, unbound conjugate is removed by washing. Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB) is added to the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. The enzyme bound in the wells converts the colorless Substrate to a blue color. Addition of Stop Solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (reference wavelength ≥ 620 nm).

### 4. Reagents provided

#### 4.1. RIDASCREEN® EBV VCA IgG (Art. No. K 6721)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations. Each test kit contains:

- 1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame; coated with capsid antigen of EBV; in a resealable foil bag
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml); Sample Diluent, ready to use; contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10x conc.); Washing Buffer, contains 0.2% Bronidox-L
- 1 x Standard Control (2.5 ml); diluted human serum, ready to use; contains 0.01% Thimerosal
- 1 x Negative Control (1.2 ml); diluted human serum, ready to use; contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroG LD (12 ml); Anti-*human-IgG*-Conjugate, ready to use; peroxidase-conjugated antibody (goat)
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml); 1 N sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

## 4.2. RIDASCREEN® EBV VCA IgM (Art. No. K 6731)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.  
Each test kit contains:

- 1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;  
coated with capsid antigen of EBV;  
in a resealable foil bag
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);  
Sample Diluent, ready to use;  
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10x conc.);  
Washing Buffer, contains 0.2 % Bronidox-L
- 1 x Standard Control (2.5 ml);  
diluted human serum, ready to use;  
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x Negative Control (1.2 ml);  
diluted human serum, ready to use;  
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroM LD (12 ml);  
Anti-human-IgM-Conjugate, ready to use;  
peroxidase-conjugated antibody (goat)
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);  
1 N sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1 Reagents

- Distilled or deionized water

### 5.2 Accessories

- Moist chamber at 37 °C
- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipets for volumes of 10 - 100 µl and 100 - 1000 µl
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, optional reference wavelength ≥ 620 nm)
- Absorbent paper

## 6. Warnings and precautions for the users

The control sera (Standard Control and Negative Control) have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as for HBsAg and were found to be negative. However, they as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

The Standard Control and the Negative Control as well as the Sample Diluent contain 0.01 % Thimerosal. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

The Washing Buffer contains Bronidox-L. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The Stop Solution contains 1 N sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of the Controls between kits of different lot numbers is not possible.

## 7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 - 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.

The diluted Washing Buffer (RIDASCREEN® SeroWP) can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

Allow reagents and Microwell Strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 - 8 °C.

It is absolutely necessary to avoid contamination of the Substrate (RIDASCREEN® SeroSC) with the conjugate solution, since this results in a coloration of the Substrate. In the same way, the colorless Substrate must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the Substrate has turned blue, the reagent should be discarded.

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the colorless Substrate prior to its use
- an absorbance value of the Negative Control at 450/620 nm > 0.3
- an absorbance value of the Positive Control at 450/620 nm out of the values given in the attached tables of values

## 9. Specimen collection and storage

The RIDASCREEN® EBV VCA EIA has been evaluated for the investigation of human serum samples. Repeated freezing and thawing of the samples as well as microbial contamination must be avoided. The application of heat treated, lipemic, hemolytic, icteric or turbid samples can lead to wrong results.

The sample material can be stored for up to 1 week at 2 - 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at -20 °C.

Diluted samples can be used for up to 7 hours if they have been stored at 2 - 8 °C.

## 10. Test procedure

### 10.1. Preliminary comments

The RIDASCREEN® EIAs for serological antibody detection contain some test independent reagents. These reagents are labeled RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, SeroG LD, SeroM LD, SeroSC, SeroStopp). They are not kit specific and can be changed between single test kits with correspondingly labeled reagents. But, this is not valid for the Controls.

Bring all reagents and the Microwell Strips to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences. A deviation from the given incubation times and temperatures leads to an excessive difference of the standard control serum to the given target value, which is no longer covered by the determined area of values. During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow Microwells to dry between steps.

Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.

Except the Washing Buffer, all reagents are ready to use.

### 10.2. Preparation of the Washing Buffer

1 part of the concentrated Washing Buffer (RIDASCREEN® SeroWP) is diluted with 9 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a waterbath at 37 °C. Add 100 ml of the concentrated Washing Buffer to a 1000 ml graduated cylinder. Bring the final volume to 1000 ml with distilled or deionized water. The diluted Washing Buffer can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

### 10.3. Preparation of the samples

Before starting the test, serum samples have to be diluted 1:100 with the Sample Diluent (RIDASCREEN® SeroPP).

Dilution of serum samples (IgG and IgM determination):

e.g. 10 µl serum + 990 µl Sample Diluent

For IgM determination, sera should be treated with an IgG-adsorbent (e.g. RIDA® G-Adsorbens, Art. No. Z 0101/Z 0102) prior to the test, following that it should be brought to its final dilution of 1:100 with the Sample Diluent.

#### **Attention!**

**Negative Control and Standard Control are ready to use and must not be diluted or adsorbed.**

### 10.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of cavities into the microwell holder, 100 µl of the diluted sera and ready to use Controls are each added to the corresponding wells, the position A1 remains empty (blank). One Negative Control and two Standard Controls are carried along. The plate is incubated in a humid chamber at 37 °C for 30 min. The bottom of the cavities should not be in touch with materials that conduct temperature well (metal or wet paper).

The Controls that correspond to the determinations (IgG or IgM) are to be used.

A1	Blank
B1	Negative Control
C1	Standard Control
D1	Standard Control
E1, F1	patient serum 1, 2, etc.

#### **Attention!**

**The ELISA plate should not be placed in a cold incubation container which is heated to 37 °C during the incubation. The container must already be adapted to 37 °C prior to the incubation.**

### 10.5. Washing

Decant or aspirate all Microwells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the Microwells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Then wash all wells 4 times with 300 µl of prepared Washing Buffer. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted Microwells on absorbent paper after single washing steps.

**If a microplate washer is used, take care that the washer is adjusted to the used microplate type.**

### 10.6. Second incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroG LD or SeroM LD (*Anti-human-IgG-* or *Anti-human-IgM-Conjugate*) into the corresponding wells (including A1). Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber.

### 10.7. Washing

Wash 4 times according to step 10.5.

### 10.8. Third incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC into each well. Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 100 µl of RIDASCREEN® SeroStopp to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured in a microplate reader at 450 nm (reference wavelength  $\geq$  620 nm). Zero adjustment is done against the blank (position A1).

**Remark:**

**To remove moisture, wipe the bottom of the microplate before measuring.**

### Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the RIDASCREEN® SeroWP
3. Dilute the serum samples
4. Pipet 100 µl of the Standard Control, the Negative Control or the diluted samples into the Microwells; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
5. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of Washing Buffer
6. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroG LD or SeroM LD; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
7. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of Washing Buffer
8. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
9. After addition of 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp spectrophotometric determination at 450 nm (reference wavelength  $\geq$  620 nm)

## 11. Analysis

Analysis of the test can be done in three different ways:

1. using the standard curve enclosed
2. using the table of values (see data sheet enclosed)
3. mathematically by the 4-parameter calculation or the  $\alpha$ -method

**The blank (A1) must be subtracted from all OD values prior to the analysis.**

### 11.1. Quality control

For the quality control, Standard Control (double determination) and Negative Control must be carried along with each test procedure. The test was carried out correctly if the mean absorbance value of the Standard Control at 450/620 nm corresponds to the value range of the data sheet enclosed. If the difference of both single measurements is larger than 20 %, the test must be repeated. The Negative Control must show an absorbance value at 450/620 nm  $<$  0.3 and must be negative in its validation.

### 11.2. Analysis with the standard curve

If the analysis is to be carried out with the standard curve, first the daily variation must be corrected by a double determination of the Standard Control (see also pt. 11.1.). The correction factor F is calculated with the given target value of the Standard Control and the actually measured Standard Control value. The Lot-dependent target value is given on the data sheet enclosed.

$$F = \frac{\text{target value of the Standard Control}}{\text{mean absorbance value of the Standard Control}}$$

All OD values of the samples are multiplied by the factor F. With these corrected values, the corresponding Unit value is read from the standard curve.

### 11.3. Analysis with the table of values

The mean absorbance value of the Standard Control (see also pt. 11.1.) determines the column of the value range in the attached value table, which is decisive for the actual measurement. Within this column the measured absorbance value of the sample is classed to the suited absorbance range and the corresponding titer in Units/ml is read in the second column from the left.

	Units/ml	range of standard control	
		0.87 - 0.92	
-	< 10.0	< 0.33	
?	10.0 - 14.0	0.33 - 0.40	
+	14.1 - 35.0	0.41 - 0.72	
	35.1 - 80.0	0.73 - 1.14	
	80.1 - 150.0	1.15 - 1.50	
	150.1 - 300.0	1.51 - 1.84	
	300.1 - 1,000	1.85 - 2.34	
	> 1,000	> 2.34	

Fig. 1: Example for IgG determination  
(Excerpt from a Lot dependent data sheet)

The mean absorbance value in a measurement is 0.89 for example. In this case, the column with the value range from 0.87 to 0.92 is decisive for result determination. Then, a patient sample with an absorbance of 0.48 lies in a titer range from 14 to 35 Units/ml. (The foregoing values are an example and can differ from the actual values of the Lot-dependent data sheet.)

The valuation of the determined results - positive (+), negative (-), equivocal (?) - can be taken from the first column of the table of values on the data sheet enclosed.

### 11.4. Mathematical analysis

Needed values for a mathematical analysis by the 4-parameter calculation or the  $\alpha$ -method are given on the data sheet enclosed.

### 11.5. Test result

Tab. 1: Valuation of calculated Units

	IgG	IgM
negative	< 10 U/ml	< 10 U/ml
equivocal	10 - 14 U/ml	10 - 13 U/ml
positive	> 14 U/ml	> 13 U/ml

## 12. Remarks about the test procedure and interpretation

The RIDASCREEN® EBV VCA EIA detects antibodies against capsid antigen of EBV. IgM antibodies against this antigen can be used as a early reference to an acute infection. Absence of IgM with a positive IgG result indicates for a latent EBV infection. For conformation of the latent stage, detection of IgG antibodies against nuclear antigen of EBV should be done (RIDASCREEN® EBV EBNA, Art. No. K6621). Those antibodies are only detectable with the transition of the virus into its latent stage.

In comparison to IgM, IgG antibodies against VCA are later detectable in the course of first infection. Then, they rise significantly and fall down slightly after having reached the latent stage. IgG titer remain detectable for the whole life.

IgG antibodies against EBV can be found in 95% of the population. As the virus remains latently in a part of the B cells after got over an acute infection, the antibody-titer against EBV could be increased again after a stimulation of the immune system; this has also an effect on the formation of IgM antibodies. Therefore, the achieved results have always to be interpreted in comparison with the clinical view. To improve the diagnostic results, it is advisable to examine two successively taken sera of one patient.

## Appendix

### Literature

1. Burkhardt, F.: Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
2. Gorgievski-Hrisoho, M., et al.: Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. *J. Clin. Mikrobiol.* 28: 2305-2311 (1990)
3. Henle, W., et al.: Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 570-574 (1987)
4. Hille, A., et al.: Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 2A and 2B in the baculovirus expression system: serological evaluation of human antibodies to these proteins. *J. Med. Virol.* 39: 233-241 (1993)
5. Linde A.: Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 100: 83-8 (1996)
6. Milman, G., et al.: Carboxyl-terminal domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen is highly immunogenic in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6300-6304 (1985)
7. Modrow, S., Falke, D.: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1997)
8. Vroman, B., et al.: Characterization of a major protein with a molecular weight of 160,000 associated with the viral capsid of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 53: 107-113 (1985)