

LOUISVILLE APL DIAGNOSTICS, INC.
AphL™ IgG HRP ELISA Kit



REF	LAPL-K-HRP-001G
-----	-----------------

Para medir os níveis de anticorpo IgG antifosfolípido

IVD	Para uso no diagnóstico <i>In Vitro</i>
-----	---



Produzido por:
Louisville APL Diagnostics, Inc.
2622 NASA Pkwy, Ste. G2
Seabrook, TX 77586 USA

Telefone: 770-455-7129

Fax: 770-455-6499

Apoio a clientes: 800-624-3192

só para EUA e Canadá

Email: support@louisvilleapl.com

Comentários: feedback@louisvilleapl.com

Página web: www.louisvilleapl.com



american diagnostica GmbH
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany
Tel. 49 61 57 / 99 08 99 • Fax 49 61 57 / 99 08 08

PT

MANUAL DE INSTRUÇÕES

APhL™ IgG HRP ELISA Kit

ÍNDICE

	Página
1 – Uso a que está destinado	4
2 – Explicação do ensaio	4
3 – Fundamentos do método	5
4 – Reagentes	5
4.1 Componentes de cada <i>APhL™ IgG HRP ELISA Kit</i>	5
4.2 Advertência	6
4.3 Equipamento necessário para o ensaio, mas não fornecido no kit	7
4.4 Armazenamento e estabilidade do kit	7
5 – Colheita e armazenamento das amostras	7
6 – Instruções para utilização	7
6.1 Comentários preliminares e precaução	7
6.2 Protocolo experimental detalhado	8
7 – Resultados	10
7.1 Elaboração da curva de calibração	10
7.2 Exemplo de curva de calibração	11
7.3 Resultados esperados	11
8 – Controlo de qualidade	12
9 – Limitações	12
10 – Características do ensaio	13
10.1 Especificidade	13
10.2 Sensibilidade	13
10.3 Reprodutibilidade	13
10.4 Recuperação	14
11 – Bibliografia	15

1 – USO A QUE ESTÁ DESTINADO

O *APhL™ IgG HRP ELISA Kit* é um teste imunoenzimático semiquantitativo (ELISA) que se usa no diagnóstico do Síndrome Antifosfolípido (APS), em pacientes que apresentam trombozes, aborto espontâneo e/ou trombocitopenia. O ensaio permite medir os níveis de anticorpo IgG antifosfolípido (anti-PL) no soro humano.

2 – EXPLICAÇÃO DO ENSAIO

O teste de anticardiolipina (1) foi desenhado para o diagnóstico de pacientes com o Síndrome Antifosfolípido (2). Este síndrome é caracterizado por trombozes venosas de repetição, aborto espontâneo e trombocitopenia associada com uma prova positiva de anticardiolipina e/ou anticoagulante do lúpus (3). Ambos os testes, o de anticorpo anticardiolipina e o de anticoagulante do lúpus, detectam anticorpos que se unem a fosfolípidos (4-5). Estes anticorpos são de natureza heterogénea, e os dois testes não identificam necessariamente os mesmos anticorpos (6-8). Deste modo, ambos os testes devem ser realizados em indivíduos onde se suspeite estar presente o Síndrome Antifosfolípido.

A presença de resultados “falso positivo”, é um dos maiores inconvenientes do teste ELISA para detecção de anticorpos anticardiolipina. É comum observar a ligação “não-específica” de soros de pacientes com uma variedade de doenças, que não são o Síndrome Antifosfolípido (9-12). Através de testes extensivos utilizando um fosfolípido e misturas de fosfolípidos, uma combinação de fosfatidilserina, ácido fosfatídico, e β 2Glicoproteína I parece ser a que permite uma melhor distinção entre os soros com Síndrome Antifosfolípido de soros de pacientes com outras doenças, em particular sífilis. Este antígeno foi designado *APhL™ Phospholipid Antigen*, e é usado para revestir os micropoços das placas do *APhL™ IgG HRP ELISA Kit*. O princípio usado neste ensaio é o mesmo que o do teste de anticardiolipina (13-14).

O *APhL™ IgG HRP ELISA Kit* está calibrado em unidades padrão de anticardiolipina (unidades GPL) (15-20) e pode ser usado para detectar anticorpos da classe IgG. Para além dos seis *Calibradores APhL™ HRP IgG*, estão ainda incluídos no kit um controlo positivo, *APhL™ HRP IgG Controlo Positivo* (com um valor definido e o erro associado) e um controlo negativo, *APhL™ HRP Controlo Negativo*. Estes dois últimos, são incluídos como controlos internos do fabricante, para determinar quando um teste é ou não aceitável.

3 – FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Neste ensaio é utilizada a técnica padrão de ELISA. Os calibradores, controles e soros dos pacientes são incubados em micropoços, existentes na placa de polistireno, revestidos com *APhL™ Phospholipid Antigen*. Este processo permite que os anticorpos antifosfolípido da classe IgG presentes no soro dos pacientes reajam com o *APhL™ Phospholipid Antigen*. O processo de lavagem remove as proteínas não ligadas. São então adicionados anticorpos específicos anti-IgG humano marcados com peroxidase. Depois de uma lavagem adicional, produz-se uma reacção colorimétrica devida à acção da peroxidase sobre o substrato tetrametilbenzidina (TMB).

4 – REAGENTES

4.1 Componentes de cada *APhL™ IgG HRP ELISA Kit*

Conferir todos os componentes do *APhL™ IgG HRP ELISA Kit* com a lista que a seguir se apresenta.

12 – tiras de polistireno com micropoços revestidos de
APhL™ Phospholipid Antigen (1 x 8 poços)



1 – 55 ml *APhL™ Tampão de Diluição* (pronto a usar) *

1 – 1,0 ml *APhL™ HRP IgG Calibrador 1* (200 GPL) (pronto a usar)

1 – 1,0 ml *APhL™ HRP IgG Calibrador 2* (100 GPL) (pronto a usar)

1 – 1,0 ml *APhL™ HRP IgG Calibrador 3* (50 GPL) (pronto a usar)

1 – 1,0 ml *APhL™ HRP IgG Calibrador 4* (25 GPL) (pronto a usar)

1 – 1,0 ml *APhL™ HRP IgG Calibrador 5* (12,5 GPL) (pronto a usar)

1 – 1,0 ml *APhL™ HRP IgG Calibrador 6* (6,25 GPL) (pronto a usar)

1 – 15 ml *APhL™ HRP IgG Conjugado* (pronto a usar)



1 – 15 ml *APhL™ Substrato TMB* (pronto a usar)



1 – 15 ml *APhL™ HRP Solução de Paragem* (pronto a usar)

1 – *APhL™ HRP PBS Concentrado* (para ser preparado em 1000 ml dH₂O)



1 – 450 µl *APhL™ HRP IgG Controlo Positivo* (para ser diluído em tampão de diluição) *

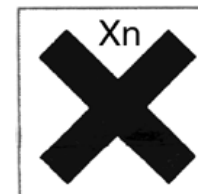


1 – 450 µl *APhL™ HRP Controlo Negativo* (para ser diluído em tampão de diluição) *

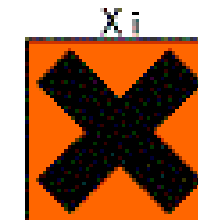
* As soluções assinaladas contêm 0,2% azida de sódio.

4.2 Advertência

- Este produto deve ser usado apenas por pessoal devidamente qualificado.
- O recurso a mecanismos automáticos para a elaboração do ensaio, diluição das amostras, ou lavagem das placas, deve ser validado pelo utilizador e comparado com o sistema manual.
- O *APhL™ IgG HRP ELISA Kit* contém componentes de origem humana que foram testados e encontrados negativos para anticorpos VIH-1, e antígeno de superfície da Hepatite B. Contudo, componentes do kit, assim como amostras a serem testadas devem ser manipuladas como potencialmente infecciosas. Usar luvas descartáveis
- A azida de sódio em condições ácidas transforma-se em ácido hidrazóico, que é uma substância muito tóxica. Evitar contacto com pele e mucosas. Em caso de acidente lavar a zona afectada imediatamente com água e consultar um médico. Compostos contendo azida foram classificados pela Comunidade Europeia (CEE) de **Xn (Nocivo)** e devem ser descartados com água corrente abundante, para evitar que os componentes tóxicos se acumulem na canalização.
- Não pipetar nenhuma solução com a boca.
- O tampão da *Solução de Paragem “Stop”* contém uma solução ácida diluída. Usar com cuidado para evitar contacto com a pele e olhos. Evitar a exposição a bases e a metais, assim como a outros compostos que possam reagir com ácidos. Derrames devem ser imediatamente limpos de forma apropriada.



- R20 Nocivo se inalado.
R21 Evitar contacto com a pele.
R22 Nocivo se ingerido.
R32 Em contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.
S2 Manter longe do alcance das crianças.
S13 Manter afastado de comida, bebida, e de produtos para alimentação animal.
S36 Usar vestuário protector adequado.
S37 Usar luvas.
S46 Se ingerido, procurar aconselhamento médico imediato e mostrar este frasco ou o respectivo rótulo.

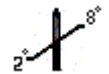


- R36 Irritante para os olhos.
R38 Irritante para a pele.

4.3 Equipamento necessário para o ensaio, mas não fornecido no kit

- Água destilada
- Agitador magnético
- Lavador automático ou semi-automático de placas ELISA
- Leitor de placas de ELISA com filtro de 450 nm
- Micropipeta multicanal (5 – 1000 µl)
- Papel absorvente
- Proveta 1000 ml
- Tubos de ensaio e respectivo suporte
- Vortex

4.4 Armazenamento e estabilidade do kit



Após abertura do *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*, manter os componentes não usados, ou por abrir, entre 2–8°C, até à data indicada no rótulo.

- Não congelar nenhum dos componentes do *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*.
- Não misturar os reagentes provenientes de diferentes lotes.
- Não substituir os componentes do kit por outros reagentes.
- Não usar reagentes depois da data de validade indicada na embalagem.

5 – COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.

O ensaio pode ser realizado em amostras de soro ou plasma de origem humana. Não devem ser usadas amostras previamente inactivadas pelo calor, a 56°C por um período igual ou superior a 30 min. Amostras hemolizadas, lipémicas ou contaminadas também devem ser evitadas. Caso as amostras não sejam analisadas num período de 24 horas após a colheita, devem ser conservadas a -20°C, ou a temperatura inferior.

6 – INSTRUÇÕES PARA UTILIZAÇÃO

6.1 Comentários preliminares e precauções

- Ler as instruções contidas no “**Manual de Instruções**” na sua totalidade antes de iniciar o ensaio.
- Os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente, antes de serem usados.
- Após utilização, guardar no frigorífico amostras e reagentes que não estão a ser usados.
- Os *Calibradores AphL™ HRP IgG* só devem ser usados com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*.
- Monitorizar cuidadosamente os períodos de incubação.

- Começar a contagem dos períodos de incubação imediatamente após a adição do último reagente.
- Usar pontas limpas para cada amostra e reagente usados.
- Não usar Tween ou outros detergentes, e certificar-se que este agente não está presente no material de vidro utilizado no ensaio.
- *AphL™ Substrato TMB* e *AphL™ HRP Solução “Stop”* devem ser manipulados cuidadosamente. Evitar o contacto destas soluções com mucosas.
- Determinar o volume necessário de cada reagente a usar antes de começar um ensaio. Calcular o volume necessário de acordo com o número de amostras a analisar.

6.2 Protocolo experimental detalhado

a. PBS (Phosphate Buffered Saline)

Retirar o conteúdo do recipiente identificado com *AphL™ HRP PBS Concentrado* para uma proveta graduada. Adicionar água destilada até perfazer o volume de 1 litro. Dissolver completamente com a ajuda de um agitador magnético. Verter para um novo recipiente apenas o volume necessário a usar no ensaio, e manter à temperatura ambiente até ser usado. Guardar a solução não usada entre 2–8°C.

b. Placas

Retirar a placa da embalagem protectora 10 minutos antes de usar. Caso não utilize toda a placa, seleccionar as tiras a serem usadas e cortar a cobertura de plástico com uma lâmina afiada. Colocar as tiras não usadas na embalagem protectora e guardar no frigorífico. Certifique-se que as tiras não usadas ficam seguras pela armação e pelo retentor após utilização.

c. Diluição dos controlos e das amostras

Os calibradores (C1–C6) estão prontos a usar. Não necessitam ser diluídos. Fazer uma diluição 1:50 para os *Controlos Positivo* e *Negativo* e para as amostras a estudar. Diluir 10 µl de *AphL™ HRP IgG Controlo Positivo*, *AphL™ HRP Controlo Negativo*, e amostras dos pacientes em 490 µl de *AphL™ HRP Tampão de Diluição*. Homogeneizar as soluções no vortex após cada diluição.

d. Adição das amostras diluídas às placas de ELISA

Adicionar 100 µl de *AphL™ HRP Tampão de Diluição* aos poços do branco. Adicionar 100 µl de cada Calibrador *AphL™ HRP IgG* (C1–C6) aos poços. Adicionar 100 µl de *AphL™ HRP IgG Controlo Positivo* diluído aos poços I. Adicionar em duplicado 100 µl de *AphL™ HRP Controlo Negativo* diluído aos poços B.

Adicionar 100 µl das amostras dos pacientes previamente diluídas.
Após adição de todas as soluções, bater suavemente na parte lateral da placa, para garantir uma distribuição homogênea das soluções nos micropoços.
Incubar as placas à temperatura ambiente durante 30 minutos.

e. Lavagem das placas

Lavar as placas 3 vezes com *APhL™ HRP PBS* (solução preparada na alínea a.). Este passo pode ser efectuado com um lavador automático ou semi-automático de placas ELISA, ou ainda usando uma micropipeta multicanal.

Para cada lavagem, adicionar 200 µl de solução a cada poço, agitar as placas suavemente e descartar a solução de *APhL™ HRP PBS*. Certifique-se que as tiras permanecem na ordem inicial. No final da terceira lavagem, inverter as placas e bater suavemente as mesmas sobre uma superfície plana coberta com papel absorvente.

f. Adição de *APhL™ HRP IgG Conjugado*

Cuidadosamente, remover do frasco original o volume de *APhL™ HRP IgG Conjugado*.

Com a ajuda de uma micropipeta multicanal, adicionar simultaneamente 100 µl de *APhL™ HRP IgG Conjugado* a cada micropoço. Tapar as placas e incubar à temperatura ambiente durante 30 ± 10 min.

g. Adição do *Substrato TMB*

Após incubação das placas com *APhL™ HRP IgG Conjugado*, lavar as mesmas 3 vezes com *APhL™ HRP PBS* (como descrito na alínea e).

Adicionar 100 µl de solução *APhL™ Substrato TMB*, a cada poço. Tapar as placas e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos exactos.

h. Terminação da reacção de coloração

Parar a reacção de coloração através da adição a cada micropoço de 100 µl *APhL™ HRP Solução de Paragem "Stop"*. Fazer a leitura da(s) placa(s) no espectrofotómetro a 450 nm. Usar os valores obtidos nos controlos (C1–C6), para elaborar a curva de calibração.

7 – RESULTADOS

7.1 Elaboração da curva de calibração

Em cada ensaio deve ser elaborada uma curva de calibração (IgG).

Determinar o valor médio das densidades ópticas (D.O.) dos calibradores (C1–C6), controlo (S) e do branco dos reagentes (B). Subtrair o valor médio das D.O. do branco (B), ao valor médio de todas as leituras (calibradores, amostras e controlos).

Elaborar um gráfico do tipo log-log (Figura 1) ou log-logit (Figura 2) com o valor das D.O. dos calibradores (C1–C6) versus a respectiva concentração. Os cálculos podem ser facilmente efectuados com a ajuda de um computador recorrendo a software apropriado. A concentração de cada calibrador está indicada no rótulo.

Figura 1. Exemplo de uma curva de calibração para anticorpos IgG anti-PL, usando uma curva log-log

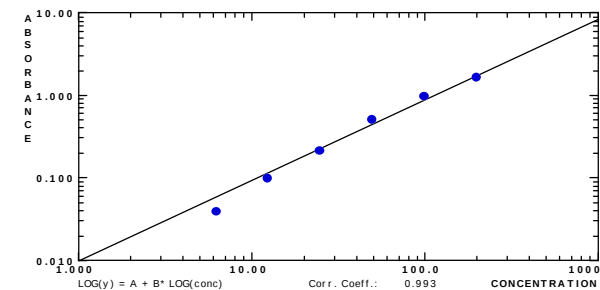
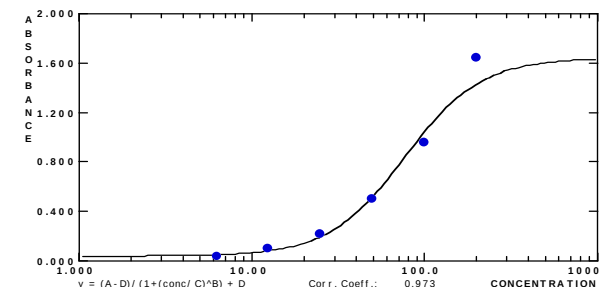


Figura 2. Exemplo de uma curva de calibração para anticorpos IgG anti-PL, usando uma curva log-logit



7.2 Exemplo de curva de calibração

Os valores de D.O. obtidos num ensaio padrão estão descritos na Tabela 1. Estes valores são apenas um exemplo, e não podem ser utilizados para elaborar a curva de calibração. Esta deve ser construída com os resultados obtidos para os calibradores em cada ensaio.

Tabela 1. Valores típicos para uma curva de calibração

Calibrador	Curva padrão IgG APhL™	
	D.O.	GPL
APhL™ HRP IgG Calibrador 1	1,802	200
APhL™ HRP IgG Calibrador 2	1,058	100
APhL™ HRP IgG Calibrador 3	0,676	50
APhL™ HRP IgG Calibrador 4	0,314	25
APhL™ HRP IgG Calibrador 5	0,147	12,5
APhL™ HRP IgG Calibrador 6	0,035	6,25

GPL: uma unidade GPL, é a actividade de ligação ao fosfolípido de 1 µg/ml de anticorpo IgG purificado por cromatografia de afinidade.

7.3 Resultados esperados

- O intervalo no qual se situa o valor de APhL™ HRP IgG Controlo Positivo está indicado no rótulo do tubo.
- Caso o APhL™ HRP IgG Controlo Positivo se situe fora do intervalo referido no rótulo, devem ser revistos os cálculos, assim como o procedimento experimental, para a existência de possíveis erros. Se não forem encontradas incorrecções, o ensaio deve ser repetido.
- Os valores inferiores a 27 GPL e superiores ao valor de cut-off, para a IgG, são considerados "indeterminados (Zona cinzenta)".
As amostras cujos valores estejam nestas condições devem ser analisadas novamente, numa data posterior, para confirmar a positividade. (21)
- O APhL™ HRP Controlo Negativo deve apresentar valores inferiores aos pontos "cut-off" de 15 unidades GPL.
- No caso de uma amostra de paciente apresentar uma D.O. superior à do Calibrador C1, a amostra deve ser diluída de forma apropriada e testada novamente. Os valores obtidos em unidades GPL devem ser multiplicados pelo(s) factor(es) de diluição.

8 – CONTROLO DE QUALIDADE

- As solução APhL™ HRP IgG Controlo Positivo e APhL™ HRP Controlo Negativo, são fornecidas no kit por forma a garantir que o ensaio está a ser realizado correctamente. O APhL™ HRP IgG Controlo Positivo, tem um valor definido de IgG antifosfolípido (consultar rótulo no frasco).
- O ensaio é considerado bem realizado quando, o valor de IgG antifosfolípido do APhL™ HRP IgG Controlo Positivo se situa dentro do intervalo dado.
- O valor médio do branco deve ser inferior a 0,2.

9 – LIMITAÇÕES

O diagnóstico do Síndrome Antifosfolípido não pode ser baseado apenas num teste positivo para anticorpos antifosfolípido. O critério para este diagnóstico inclui história clínica de pelo menos um dos acontecimentos: trombozes, aborto espontâneo, ou trombocitopenia, associado a um teste de ELISA antifosfolípido positivo e/ou um teste positivo para lúpus anticoagulante. Os pacientes podem apresentar um teste positivo para lúpus anticoagulante, mas negativo para antifosfolípido. Deste modo, ambos os testes devem ser realizados em pacientes onde se suspeite a presença do Síndrome Antifosfolípido.

Apesar do APhL™ IgG HRP ELISA Kit, reduzir substancialmente o número de amostras com sífilis, capazes de produzir um resultado positivo, é possível que isso aconteça em algumas delas. Pode-se ainda acrescentar que uma variedade de doenças infecciosas, incluindo doentes VIH+ e desordens de natureza farmacológica, poderem vir a conduzir a um falso positivo.

10 – CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

10.1 Especificidade

Normal

Foram ensaiadas 50 amostras de dadores saudáveis com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*. Um “cut-off” de 15 unidades GPL foi determinado, baseado no percentil de 99%.

Doente

Amostras para várias patologias foram testadas com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*. Os valores obtidos são descritos a seguir na Tabela 2.

Tabela 2. Amostras para várias patologias

Patologia	nº amostras	nº amostras positivas *
APS (Síndrome antifosfolípido)	43	43
Sífilis +	16	1
Outras doenças auto-imunes	16	1

*Positivo é definido quando o valor de IgG anti-PL é maior que 15 unidades GPL.

10.2 Sensibilidade

Soros de 43 doentes, portadores do Síndrome Antifosfolípido, foram testados com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*. Todos revelaram ser positivos para anticorpos IgG antifosfolípido.

10.3 Reprodutibilidade

Variações Intra-ensaio

Para avaliar as variações intra-ensaio, cada uma das 3 amostras (A, B e C), descritas na Tabela 3, contendo anticorpos IgG anti-PL foi analisada 10 vezes na mesma placa usando o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*. Os valores estatísticos foram calculados e estão representados a seguir.

Tabela 3. Variações intra-ensaio, com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*
Amostras de IgG

Amostra	v.m.	d.p.	% c.v.
A	85,2	4,5	4,2
B	24,0	3,2	8,7
C	8,9	2,4	8,0

v.m., valor médio; d.p. desvio padrão; c.v., coeficiente de variação

Variações Inter-ensaio

Variações inter-ensaio foram efectuadas testando 3 amostras positivas (elevada, média e baixa) para anticorpos IgG anti-PL usando o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit* em 10 ensaios independentes. Os valores obtidos estão representados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Variações inter-ensaio, com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*
Amostras de IgG

Amostra	v.m.	d.p.	% c.v.
A	86,5	8,5	7,5
B	21,5	2,5	10,2
C	11,2	2,3	14,3

v.m., valor médio; d.p. desvio padrão; c.v., coeficiente de variação

10.4 Recuperação

Aliquotas da solução *AphL™ HRP IgG Calibrador 1*, diluídas em soro normal, como descrito na Tabela 5, foram ensaiadas com o *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*. Os valores de GPL esperados foram determinados dividindo a concentração do *AphL™ HRP IgG Calibrador* pelo factor de diluição. Os valores de GPL observados foram calculados com base na curva padrão.

Tabela 5 Determinação dos valores de recuperação do *AphL™ HRP IgG Calibrador 1* no *AphL™ IgG HRP ELISA Kit*

Diluição do calibrador	GPL observados	GPL esperados	% recuperação
--	212,0	200,0	106
1:2	92,0	100,0	92
1:4	48,0	50,0	96
1:8	22,0	25,0	88
1:16	14,6	12,5	116
1:32	5,2	6,25	83

11 – BIBLIOGRAFIA

1. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis. *Lancet*. 1983 Nov 26;2(8361):1211-4.
2. Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol*. 1987 Oct;26(5):324-6.
3. Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies-autoantibodies with a difference. *Annu Rev Med* 1988;39: 261-71.
4. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, Chan JK, Englert H, Mantelli P, Allegro F, Balliestieri G, Hughes GR. Affinity purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies. *J Clin Lab Immunol*. 1985 Aug;17(4):155-62.
5. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood*. 1987 Jul;70(1):69-76.
6. Derksen RH, Biesma D, Bouma BN, Gmelig Meyling FH, Kater L. Discordant effects of prednisone on anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum*. 1986 Oct;29(10):1295-6.
7. Lockshin MD, Qamar T, Druzin ML, Goei S. Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant, and fetal death. *J Rheumatol*. 1987 Apr;14(2):259-62.
8. Triplett DA, Brandt JT. Lupus anticoagulants: misnomer, paradox, riddle, epiphenomenon. *Hematol Pathol*. 1988;2(3):121-43.
9. Vaarala O, Palosuo T, Kleemola M, Aho K. Anticardiolipin response in acute infections. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986 Oct;41(1):8-15.
10. Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol*. 1990 Jan;74(1):1-9.
11. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Miyawaki N, Morse JH, Zarrabi MH, Lockshin MD. Characteristics of HIV and chlorpromazine induced antiphospholipid antibodies: effect of β_2 Glycoprotein I on binding to phospholipid. *J Rheumatol* 1994 Jan;21(1):94-9.
12. Pierangeli SS, Goldsmith DH, Krnic S, Harris EN. Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome. *Infect Immun*. 1994 Sep;62(9):4081-4.
13. Harris EN, Pierangeli SS. A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol Newslet* 1995 15:2628-30.
14. Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Harris EN, Polisson RP. Comparison between the standard anticardiolipin antibody test and a new phospholipid test in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol*. 1999 Mar;26(3):591-6.
15. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held April 4 1986. *Clin Exp Immunol*. 1987 Apr;68(1):215-22.
16. Harris EN. Special report. The second international anti-cardiolipin standardization workshop / the Kingston Anti-phospholipid Antibody Study (KAPS) Group. *Am J Clin Pathol*. 1990 Oct;94(4):476-84.
17. Pierangeli SS, Stewart M, Silva LK, Harris EN. An antiphospholipid wet workshop: 7th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol*. 1998 Jan;25(1):156-60.
18. Harris EN, Pierangeli SS. 'Equivocal' antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*. 2000 Sep;15(2):81-5.
19. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol*. 2001 Mar;44(1):48-57; quiz 58-9.
20. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus*. 2002;11(5):269-75
21. Budd et al. A re-appraisal of the normal cut-off assignment for anticardiolipin IgM tests. *J Thromb Haemostasis*. 2006; 4: 2210-2214.



Louisville APL Diagnostics, Inc.

Revision #5 – Julho 10, 2007

REF	LAPL-K-HRP-001G
-----	-----------------