

VETSCAN®

Профіль фенобарбіталу - Phenobarbital Profile

Січень 2023

PN: 51630100

© 2023, Abaxis, Inc., Union City, CA 94587

1. Призначення

Реагентний ротор VetScan® Phenobarbital Profile, який використовується з аналізатором VetScan VS2 Chemistry Analyzer, застосовує сухі та рідкі реагенти для *in vitro* кількісного визначення аланінамінотрансферази (ALT), альбуміну (ALB), лужної фосфатази (ALP), аспартатамінотрансферази (AST), азоту сечовини крові (BUN), гамма-глутамілтрансферази (GGT), фенобарбіталу (PHB) та загального білірубину (TBIL) у гепаринізованій цільній крові, гепаринізованій плазмі або сироватці.

2. Стислий опис досліджень

Реагентний ротор VetScan Phenobarbital Profile та аналізатор VetScan VS2 Chemistry Analyzer становлять діагностичну систему *in vitro*, яка допомагає ветеринарам контролювати рівень фенобарбіталу під час визначення стану печінки:

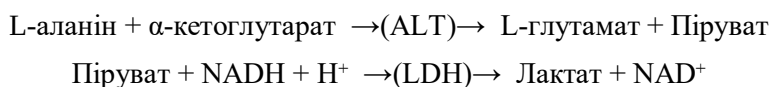
Аланінамінотрансфераза (ALT)	Захворювання печінки, зокрема вірусний гепатит і цироз; захворювання серця.
Альбумін (ALB)	Захворювання печінки та нирок.
Лужна фосфатаза (ALP)	Захворювання печінки, кісток, паразитоподібних залоз та кишечника.
Аспартатамінотрансфераза (AST)	Захворювання печінки, зокрема гепатит і вірусна жовтяниця; шок.
Азот сечовини крові (BUN)	Захворювання печінки та нирок.
Гамма-глутамілтрансфераза (GGT)	Захворювання печінки, первинні та вторинні пухлини печінки.
Фенобарбітал (PHB)	Протисудомний препарат, що застосовується для запобігання нападам.
Загальний білірубін (TBIL)	Патологія печінки.

Як і при будь-якій діагностичній процедурі, перед встановленням остаточного діагнозу слід враховувати всі інші дослідження, включно з клінічним станом пацієнта.

3. Принципи методики

Аланінамінотрансфераза (ALT)

Метод, розроблений для використання на аналізаторі VetScan VS2 Chemistry Analyzer, є модифікацією процедури Wróblewski та LaDue, рекомендованої Міжнародною федерацією клінічної хімії (IFCC).^{1,2} У цій реакції ALT каталізує перенесення аміногрупи від L-аланіну до α -кетоглутарату з утворенням L-глутамату та пірувату. Лактатдегідрогеназа каталізує перетворення пірувату на лактат. Одночасно NADH окислюється до NAD⁺, як показано на наведеній нижче схемі реакції.



Швидкість зміни різниці поглинання між 340 нм і 405 нм зумовлена перетворенням NADH на NAD⁺ і прямо пропорційна кількості ALT у зразку.

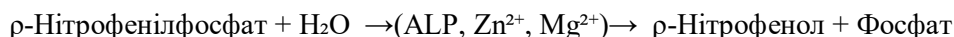
Альбумін (ALB)

Методи барвникового зв'язування є найбільш поширеними для вимірювання альбуміну. Бромкрезоловий зелений (BCG) — найчастіше використовуваний з методів барвникового зв'язування.³

BCG + Альбумін → (Поверхнево-активні речовини, кисле рН) → BCG-Альбуміновий комплекс
Зв'язаний альбумін пропорційний концентрації альбуміну у зразку. Це кінцева (endpoint) реакція, яка вимірюється бихроматично при 630 нм і 405 нм.

Лужна фосфатаза (ALP)

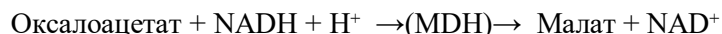
Методика VetScan є модифікацією методів AACC та IFCC.⁴ Лужна фосфатаза гідролізує р-NPP у буфері з металевими іонами, утворюючи р-нітрофенол і фосфат. Використання р-нітрофенілфосфату (р-NPP) підвищує швидкість реакції.^{5,6} Надійність цієї методики значно підвищується завдяки використанню буфера з металевими іонами для підтримання концентрації іонів магнію та цинку в реакції.⁷ Референтний метод Американської асоціації клінічної хімії (AACC) використовує р-NPP як субстрат і буфер на основі металевих іонів.⁸



Кількість ALP у зразку пропорційна швидкості зростання різниці поглинання між 405 нм і 500 нм.

Аспартатамінотрансфераза (AST)

Метод AST компанії Abaxis є модифікацією референтного методу IFCC.^{9,10} Цей метод каталізує реакцію L-аспартату з α-кетоглутаратом з утворенням оксалоацетату та L-глутамату. Оксалоацетат перетворюється на малат, а NADH окислюється до NAD⁺ за допомогою ферменту малатдегідрогенази (MDH).

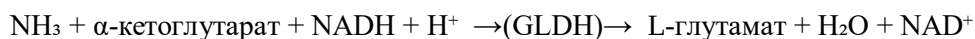
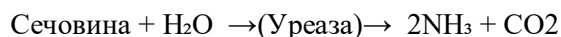


Швидкість зміни поглинання, спричиненої перетворенням NADH на NAD⁺, визначається бихроматично при 340 нм і 405 нм. Ця швидкість прямо пропорційна кількості AST у зразку.

Азот сечовини крові (BUN)

Сечовину можна вимірювати як прямим, так і непрямим методом. Реакція з діацетилмонооксимом — єдиний прямий метод визначення сечовини — широко застосовується, однак вимагає використання небезпечних реагентів.¹¹ Непрямі методи вимірюють аміак, утворений із сечовини; використання ферменту уреазі підвищило специфічність цих тестів.¹² Кількість аміаку визначають різними методами, зокрема несслеризацією (кислотним титруванням), методом Бертло^{13,14} та сполученими ферментативними реакціями.^{15,16} Однак каталізовані методи Бертло дають нестабільні результати при вимірюванні аміаку.¹⁷ Сполучені ферментативні реакції є швидкими, мають високу специфічність до аміаку та широко застосовуються. Одну з таких реакцій запропоновано як кандидатний референтний метод.¹⁸

У сполученій ферментативній реакції уреазі гідролізує сечовину до аміаку та вуглекислого газу. Після поєднання аміаку з α-кетоглутаратом і відновленим нікотинамідаденіндинуклеотидом (NADH) фермент глутаматдегідрогеназа (GLDH) окислює NADH до NAD⁺.



Швидкість зміни різниці поглинання між 340 нм і 405 нм зумовлена перетворенням NADH на NAD⁺ і прямо пропорційна кількості сечовини у зразку.

Гамма-глутамілтрансфераза (GGT)

Перші кількісні методи, розроблені для вимірювання гамма-глутамілтрансферази (GGT), передбачали проведення другої реакції з утворенням азобарвника у поєднанні з хромофором.^{19, 20} Перехід на L-γ-глутаміл-п-нітроанілід як субстрат реакції усунув необхідність окремого етапу утворення барвника.²¹ Через погану розчинність і стабільність L-γ-глутаміл-п-нітроаніліду цю методику модифікували з використанням субстрату L-γ-глутаміл-3-карбокси-4-нітроаніліду.²² Метод визначення GGT, рекомендований Міжнародною федерацією клінічної хімії (IFCC), базується на останньому субстраті, а гліцилгліцин виступає другим субстратом.²³

Abaxis модифікувала метод IFCC для реакції при 37 °C. Додавання зразка, що містить гамма-глутамілтрансферазу, до субстратів L-γ-глутаміл-3-карбокси-4-нітроаніліду та гліцилгліцину (глі-глі) спричиняє утворення L-γ-глутаміл-гліцилгліцину (глу-глі-глі) та 3-карбокси-4-нітроаніліну.

$$\text{L-}\gamma\text{-глутаміл-3-карбокси-4-нітроанілід} + \text{Глі-глі} \xrightarrow{(\text{GGT})} \text{Глу-глі-глі} + \text{3-карбокси-4-нітроанілін}$$

Поглинання цієї кінетичної реакції вимірюється при 405 нм. Утворення 3-карбокси-4-нітроаніліну прямо пропорційне активності GGT у зразку.

Фенобарбітал (PHB)

Abaxis адаптувала комерційно доступний гомогенний метод визначення фенобарбіталу (PHB) для використання в аналізаторі VetScan VS2 Chemistry Analyzer. У цій реакції PHB конкурує з ферментом глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою, міченою PHB (ферментний кон'югат), за місця зв'язування з антитілом (Ab). Зв'язаний з антитілом ферментний кон'югат має нижчу активність, ніж незв'язаний кон'югат. Високі рівні зв'язування PHB з антитілом призводять до підвищення активності ферментного кон'югату. Активний фермент відновлює нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD⁺) до NADH.

$$\text{PHB} + \text{Ферментний кон'югат} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{(\text{Ab})} \text{Ab-PHB} + \text{Ab-Ферментний кон'югат} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Швидкість зміни поглинання при 340 нм зумовлена перетворенням NAD⁺ на NADH і прямо пропорційна кількості фенобарбіталу у зразку.

Загальний білірубін (TBIL)

Рівень загального білірубину зазвичай вимірювали за допомогою тестів із застосуванням діазотованої сульфанілової кислоти.^{24, 25} Було розроблено новіший, більш специфічний метод з використанням ферменту білірубіноксидази.^{26–28} Крім використання більш специфічного методу визначення загального білірубину, фотодеградація аналіту мінімізується завдяки тому, що зразок можна тестувати одразу після забору.

У ферментативній процедурі білірубін окислюється білірубіноксидазою до білівердину. Кількість білірубину визначається як різниця поглинання між 467 нм і 550 нм. Початкове поглинання цієї кінцевої (endpoint) реакції визначається за холостою кюветою білірубину, а кінцеве поглинання отримується з тестової кювети білірубину. Кількість білірубину в зразку пропорційна різниці між початковим і кінцевим вимірюваннями поглинання.

$$\text{Білірубін} + \text{O}_2 \xrightarrow{(\text{Білірубіноксидаза})} \text{Білівердин} + \text{H}_2\text{O}$$

4. Принцип роботи

Див. посібник оператора аналізатора VetScan VS2 Chemistry Analyzer щодо принципів та обмежень методики.

5. Опис реагентів

Реагенти

Кожен реагентний ротор VetScan Phenobarbital Profile містить сухі реагентні гранули, специфічні для кожного тесту. Сухий реагент «холостої проби зразка» (buffer blank reagent), що складається з буфера, поверхнево-активних речовин, допоміжних речовин і консервантів, включений до кожного реагентного ротора для розрахунку концентрацій аланінамінотрансферази (ALT), альбуміну (ALB), лужної фосфатази (ALP), аспартатамінотрансферази (AST), азоту сечовини крові (BUN), гамма-глутамілтрансферази (GGT) та фенобарбіталу (PHB). Окрема холоста проба включена до ротора для розрахунку концентрації загального білірубіну (TBIL). Кожен реагентний ротор також містить розчинник, що складається з поверхнево-активних речовин і консервантів.

Попередження та застереження

Тільки для *in vitro* діагностичного застосування.

- Контейнер з розчинником у реагентному роторі автоматично відкривається, коли закривається шухляда аналізатора. Ротор з відкритим контейнером розчинника не можна використовувати повторно. Перед закриттям шухляди переконайтеся, що зразок або контроль вже поміщено в ротор.
- Реагентні ротори виготовлені з пластику і можуть тріснути або відколотися при падінні. **Ніколи** не використовуйте ротор, який упав.
- Реагентні гранули можуть містити кислоти або їдкі речовини. Оператор не контактує з реагентними гранулами при дотриманні рекомендованих процедур. У разі контакту з гранулами (наприклад, під час прибирання після падіння або тріщини ротора) уникайте потрапляння всередину, на шкіру або вдихання.
- Деякі реагентні гранули містять азид натрію, який може реагувати зі свинцевими та мідними трубами з утворенням вибухонебезпечних азидів металів. Реагенти не контактують із свинцевими та мідними трубами при дотриманні рекомендованих процедур. Однак якщо реагенти все ж потрапили на такі труби, промийте великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азиду.

Інструкції з поводження з реагентами

Реагентні ротори можна використовувати одразу з холодильника без попереднього нагрівання. Відкрийте запаяний фольгований пакет і вийміть ротор, уникаючи торкання кільця зі штрих-кодом, розташованого зверху ротора. Використовуйте згідно з інструкціями, наведеними в посібнику оператора VetScan VS2. Ротор, не використаний протягом 20 хвилин після відкриття пакета, слід утилізувати. Ротори з відкритих пакетів не можна повертати назад у холодильник для подальшого використання.

Зберігання

Зберігайте реагентні ротори в запаяних пакетах при температурі 2–8 °C (36–46 °F). Не піддавайте відкриті або закриті ротори впливу прямого сонячного світла або температур вище 32 °C (90 °F). Не допускайте, щоб ротори, запаяні у фольгованих пакетах, залишалися за кімнатної температури довше 48 годин перед використанням. Відкривайте пакет і виймайте ротор безпосередньо перед використанням.

Ознаки нестабільності або погіршення якості реагентного ротора

- Усі реагенти в реагентному роторі за умови зберігання, описаного вище, стабільні до дати закінчення терміну придатності, вказаної на пакеті ротора. Не використовуйте ротор після закінчення терміну придатності. Дата закінчення терміну придатності також закодована у штрих-коді, надрукованому на кільці зі штрих-кодом. Якщо реагенти прострочені, на дисплеї аналізатора VetScan VS2 Chemistry Analyzer з'явиться повідомлення про помилку.

- Розірваний або іншим чином пошкоджений пакет може пропускати вологу до невикористаного ротора та негативно впливати на роботу реагентів. Не використовуйте ротор із пошкодженого пакета.

6. Прилад

Див. посібник оператора VetScan VS2 щодо повної інформації про використання аналізатора.

7. Забір і підготовка зразка

Техніки забору зразка описані в розділі «Sample Collection» посібника оператора аналізатора VetScan VS2 Chemistry Analyzer.

- Мінімальний необхідний обсяг зразка становить ~100 мкл гепаринізованої цільної крові, гепаринізованої плазми та сироватки або контрольного матеріалу. Камера для зразка реагентного ротора може вмістити до 120 мкл зразка.
- Використовуйте лише вакуумні пробірки для забору зразків з літій-гепарином (зелена кришка) для цільної крові або плазми. Використовуйте вакуумні пробірки без добавок (червона кришка) або пробірки-сепаратори сироватки (червона або червоно-чорна кришка) для зразків сироватки.
- Зразки цільної крові, отримані шляхом венепункції, повинні бути гомогенними перед перенесенням зразка в реагентний ротор. Обережно перевертайте пробірки для забору кілька разів безпосередньо перед перенесенням зразка. **Не** струшуйте пробірку для забору; струшування може спричинити гемоліз.
- Зразки, отримані шляхом венепункції цільної крові, слід аналізувати протягом 60 хвилин після забору; якщо це неможливо, відокремте зразок і перенесіть його в чисту пробірку.²⁹ Аналізуйте відокремлену плазму або сироватку протягом 5 годин після центрифугування. Якщо це неможливо, зберігайте зразок у закритій пробірці при температурі 2–8 °C (36–46 °F) не довше 48 годин. Зразок плазми або сироватки можна зберігати при -10 °C (14 °F) до 5 тижнів у морозильній камері без циклу автоматичного розморожування.
- Тест необхідно розпочати протягом 10 хвилин після перенесення зразка в реагентний ротор.
- Пробірки для забору крові з гелем **не можна** використовувати для відокремлення плазми та сироватки, оскільки це може спричинити зміни концентрації **фенобарбіталу**.³⁰
- Рекомендується заповнювати зразки до лінії наповнення, вказаної виробником на етикетці пробірки, незалежно від розміру пробірки. Ці лінії призначені для підтримання співвідношення крові та добавки протягом усього терміну придатності пробірки. Пробірка повинна бути заповнена щонайменше наполовину.
- Охолодження зразків цільної крові може спричинити значні зміни концентрації **аспартатамінотрансферази**.³¹
- **Результати визначення загального білірубину** можуть зазнавати негативного впливу фотодеградації.³² Зразки цільної крові, які не аналізуються негайно, слід зберігати в темряві не довше 60 хвилин. Якщо зразок неможливо проаналізувати протягом цього періоду, його слід відокремити на плазму або сироватку та зберігати в закритій пробірці для зразків у темряві за низьких температур.³³

Відомі речовини-перешкоди

- Єдиним антикоагулянтом, рекомендованим для використання з аналізатором VetScan VS2 Chemistry Analyzer, є літій-гепарин. Натрій-гепарин не можна використовувати під час забору зразків крові для цієї панелі. Abaxis провела дослідження, які демонструють, що

EDTA, фторид, оксалат та будь-який антикоагулянт, що містить іони амонію, впливатимуть щонайменше на один показник у реагентному роторі VetScan Phenobarbital Profile.

- Фізичні перешкоди (гемоліз, іктеричність та ліпемія) можуть спричиняти зміни у зареєстрованих концентраціях деяких аналітів. Індeksi зразка друкуються внизу кожного роздруку результатів, щоб інформувати оператора про рівні перешкоджаючих факторів у кожному зразку. Аналізатор VetScan Whole Blood Analyzer приховує будь-які результати, на які суттєво впливають гемоліз, ліпемія або іктеричність. Замість результату на роздруку друкується «HEM», «LIP» або «ICT».

Екзогенні перешкоди

Нижче наведено речовини, які не впливають на аналіз фенобарбіталу за досліджуваних концентрацій.

Речовина	Досліджена концентрація (мкг/мл)
Бромід калію	3000
Діазепам	0,6
Леветирацетам	45
Зонісамід	40
Вальпроєва кислота	100
Прегабалін	11
Фенітоїн натрію	15
5-(4-гідроксифеніл)-5-фенілгідантоїн	20
Хлорпромазину гідрохлорид	100
Амітриптиліну гідрохлорид	100

8. Процедура

Надані матеріали

- Один реагентний ротор VetScan Phenobarbital Profile, PN: 500-1049 (упаковка з 12 роторів, PN: 500-0049-12)

Матеріали, необхідні, але не надані

- Аналізатор VetScan VS2 Chemistry Analyzer

Параметри тесту

Система VetScan працює за температури навколишнього середовища від 15 °C до 32 °C (59–90 °F). Час аналізу для кожного реагентного ротора VetScan Phenobarbital Profile становить приблизно 12 хвилин. Аналізатор підтримує температуру реагентного ротора на рівні 37 °C (98,6 °F) протягом усього періоду вимірювання.

Процедура тестування

Повна процедура забору зразка та покрокова робоча процедура детально описані в посібнику оператора VetScan VS2.

Калібрування

Аналізатор VetScan VS2 Chemistry Analyzer калібрується виробником перед відвантаженням. Штрих-код, надрукований на кільці зі штрих-кодом, надає аналізатору калібрувальні дані, специфічні для ротора. Див. посібник оператора VetScan VS2.

Контроль якості

Контролі можуть періодично прогонятися на аналізаторі VetScan VS2 Chemistry Analyzer для перевірки точності аналізатора. Abaxis рекомендує використовувати комерційно доступний контроль на основі сироватки. Прогоняйте контролі на реагентному роторі так само, як і зразки пацієнтів. Див. посібник оператора VetScan VS2 щодо запуску контролів.

9. Результати

Аналізатор VetScan VS2 Chemistry Analyzer автоматично розраховує та друкує концентрації аналітів у зразку. Деталі розрахунків кінцевої точки (endpoint) та швидкості реакції наведені в посібнику оператора VetScan VS2.

10. Обмеження методики

Загальні процедурні обмеження описані в посібнику оператора VetScan VS2.

- Якщо результат конкретного тесту перевищує діапазон аналізу, зразок слід проаналізувати іншим затвердженим методом тестування або надіслати до референтної лабораторії.
- Зразки з гематокритом, що перевищує 62% об'єму упакованих еритроцитів, можуть давати неточні результати. Зразки з високим гематокритом можуть бути позначені як гемолізовані. Такі зразки можна відцентрифугувати, а отриману плазму повторно прогнати в новому реагентному роторі.

Попередження: Розширене тестування аналізатора VetScan VS2 Chemistry Analyzer показало, що у дуже рідкісних випадках зразок, дозований у реагентний ротор, може не потрапляти рівномірно в камеру для зразка. Через нерівномірний потік може бути проаналізована недостатня кількість зразка, і кілька результатів можуть виходити за межі встановлених референтних діапазонів. Зразок можна повторно прогнати, використовуючи новий реагентний ротор.

11. Характеристики продуктивності

Лінійність

Хімічна реакція для кожного аналіту є лінійною в межах динамічного діапазону, вказаного нижче, коли система VetScan експлуатується згідно з рекомендованою процедурою (див. посібник оператора VetScan VS2). Наведена нижче таблиця динамічних діапазонів відображає спектр значень, які може визначити система VetScan. **Наведені нижче інтервали не є нормальними (референтними) діапазонами.**

Таблиця 2: Динамічні діапазони VetScan

Аналіт	Загальноприйняті одиниці	Одиниці CI
Аланінамінотрансфераза (ALT)	5 – 2000 Од/л	5 – 2000 Од/л
Альбумін (ALB)	1 – 6,5 г/дл	10 – 65 г/л
Лужна фосфатаза (ALP)	5 – 2400 Од/л	5 – 2400 Од/л
Аспартатамінотрансфераза (AST)	5 – 2000 Од/л	5 – 2000 Од/л
Азот сечовини крові (BUN)	2 – 180 мг/дл	0,7 – 64,3 ммоль сечовини/л
Гамма-глутамілтрансфераза (GGT)	5 – 3000 Од/л	5 – 3000 Од/л
Фенобарбітал (PHB)	5,0 – 60,0 мкг/мл	21,6 – 258,6 мкмоль/л
Загальний білірубін (TBIL)	0,1 – 30 мг/дл	1,7 – 513 мкмоль/л

12. Бібліографія

(Бібліографічні джерела наведено мовою оригіналу відповідно до наукової практики цитування — назви статей і журналів не перекладаються, щоб зберегти точність посилань.)

1. Wroblewski F, LaDue JS. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;91(4):569-571.
2. Bergmeyer HU; Hørdler M. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC Method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1980;18(8):521-534.
3. Webster D, Bignell AH, Attwood EC. An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta*. 1974;53(1):101-108.
4. Bowers GN; Bergmeyer HU; Hørdler M; Moss DW; IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 1. General considerations concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *Clin Chim Acta*. 1979;98:(1-2)pp:163F-174F.
5. Ohmori Y. Über die Phosphomonoesterase. *Enzymologia*. 1937;4(July 29):217-231.
6. Fujita H. Über die Mikrobestimmung der Blutphosphatase. *J Biochem*. 1939;30(1):69-87.
7. PetitClerc C, Delisle M, Martel M, Fecteau C, Brière N. Mechanism of Action of Mg^{2+} and Zn^{2+} on Rat Placental Alkaline Phosphatase. I. Studies on the Soluble Zn^{2+} and Mg^{2+} Alkaline Phosphatases. *Can J Biochem*. 1975;53(10):1089-1100.
8. Tietz NW, Burtis CA, Duncan P, et al. A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem*. 1983;29(5):751-761.
9. Bergmeyer HU, Bowers GN, Horder M, Moss DW. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta*. 1977;23:887-899.
10. Bergmeyer HU, Bowers GN, Horder M, Moss DW. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta*. 1978;24:720-721.
11. Fales FW. Urea in serum, direct diacetyl monoxime method. *Sel Methods Clin Chem*. 1982;9:365-373.
12. Van Slyke, Donald D; Cullen GE. A permanent preparation of urease, and its use in the determination of urea. *J Biol Chem*. 1914;19(2):211-228.
13. Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol*. 1960;13(2):156-159.
14. Chaney AL, Marbach EP. Urea and ammonia determinations. *Clin Chem*. 1962;8:130-132.
15. Talke H, Schubert GE. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wochenschr*. 1965;43(3):174-175.
16. Hallett CJ, Cook JGH. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. *Clin Chim Acta*. 1971;35(1):33-37.
17. Patton CJ, Crouch SR. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal Chem*. 1977;49(3):464-469.
18. Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem*. 1980;26(7):816-826.
19. Ball EG, Cooper O, Revel JP. The quantitative measurement of gamma glutamyl transpeptidase activity. *J Biol Chem*. 1956;221(2):895-908.
20. Goldbarg JA, Friedman OM, Pineda EP, et al. The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys*. 1960;91(1):61-70.
21. Orłowski M, Meister A. γ -Glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of l- and d- γ -glutamyltranspeptidase activities. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Specialized Sect Enzymol Subj*. 1963;73(4):679-681.
22. Persijn JP, van der Slik W. A New Method for the Determination of γ -Glutamyltransferase in Serum. *Clin Chem Lab Med*. 1976;14(1-12):421-428.

23. Shaw ML. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4 IFCC method for γ -glutamyl-transferase. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983;21:633-646.
24. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem*. 1937;119(2):481-490.
25. Meites S. Bilirubin, direct reacting and total, modified Mally-Evelyn method. *Sel Methods Clin Chem Faulkner WR, Meites S, eds Washington, DC Am Assoc Clin Chem*. 1982;9:119-124.
26. Murao S, Tanaka N. Agricultural and Biological Chemistry A New Enzyme "Bilirubin Oxidase" Produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1. *Agric Biol Chem Agric Biol Chem*. 1981;45(10):2383-2384.
27. Osaki S, Anderson S. Enzymatic determination of bilirubin. *Clin Chem*. 1982;30:971 (Abstract).
28. Perry B, Doumas BT, Buffone G, Glick M, Ou CN, Ryder K. Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase. *Clin Chem*. 1986;32(2):329-332.
29. The Clinical & Laboratory Standard Institute. *Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens; Tentative Standard. CLSI Document H18-A2*. 2nd ed. Wayne, PA; 1999.
30. Bergqvist Y, Eckerbom S, Funding L. Effect of use of gel-barrier sampling tubes on determination of some antiepileptic drugs in serum. *Clin Chem*. 1984;30(3):465-466.
31. Rehak NN, Chiang BT. Storage of whole blood: effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. *Clin Chem*. 1988;34(10):2111-2114.
32. Sherwin JE, Obernolte R. Bilirubin. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*. 2nd ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1989:1009-1015.
33. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. *Clinical Chemistry: Principles and Technics*. 2nd ed. New York: Harper and Row; 1974.