

# Variables pre-analíticas que afectan las concentraciones de homocisteína: Aplicación para biobancos con fines de investigación

## *Pre-analytical variables that affect homocysteine concentrations: Applications for research biobanks*

Norma C. Serrano Díaz, MD Msc \*§

María Carolina Páez Leal, MD Msc \*

Paula Katherine Bautista Niño, Bact \*

Luis Alfonso Díaz-Martínez, MD Msc \*¶

Elizabeth Guío Mahecha, Bact \*

### Resumen

**Objetivo:** El presente estudio evaluó el impacto de variables pre-analíticas sobre las concentraciones séricas de la homocisteína y su posible aplicación en biobancos con fines de investigación. **Metodología:** En diez adultos voluntarios auto declarados sanos, se tomaron muestras de sangre periférica bajo diferentes condiciones de ayuno, posición de toma de la muestra (supino versus sentada) y diferentes intervalos de tiempo entre la toma y la separación definitiva de componentes. Todas las alícuotas fueron almacenadas a -80°C en el biobanco hasta el momento de ser procesadas. La medición de homocisteína se hizo por duplicado en Immulite® 2000. Se realizó análisis de concordancia por medio de coeficiente de Lin ( ) y MANOVA. **Resultados:** La medición de homocisteína es altamente reproducible ( =0.908, IC95% 0.861 a 0.955), sin que el ayuno o el tiempo de centrifugación de la muestra afecte su concentración. Sin embargo, la posición al momento de la toma de muestra, implica una reducción media de 14.2% (IC95% 8.4% a 20.0%) en la concentración de homocisteína en posición decúbito supino versus la toma en posición sentado. **Conclusión:** La homocisteína es un biomarcador estable, sin que su valor se vea alterado por variables pre-analíticas como los tiempos entre toma de muestra, centrifugación y separación de componentes (almacenamiento temporal a 4°C hasta 24 horas). Sin embargo, la postura del participante al momento de la toma de muestra produce una variabilidad significativa. Estos hallazgos reiteran el papel de un biobanco en la estandarización de los procesos de toma, manipulación, almacenamiento y gestión con criterios de excelencia. [Serrano NC, Páez MC, Bautista PK, Díaz-Martínez LA, Guío E. Variables pre-analíticas que afectan las concentraciones de homocisteína: Aplicación para biobancos con fines de investigación. MedUNAB 2013; 16(2):59-64].

**Palabras clave:** Homocisteína, Control de calidad, Estándares, Estándares de referencia, Variables pre-analíticas, Biobanco.

### Abstract

**Objective:** This study evaluated the impact of pre-analytical variables on serum concentrations of homocysteine, and its possible applications in biobanks for research purposes. **Methods:** Peripheral blood samples from ten self-reported healthy volunteers were obtained under different conditions of fasting and body position (supine and sitting). Blood samples were temporarily stored for different time intervals between its collection and its centrifugation. All aliquots were stored at -80°C in our biobank until processing. Duplicate Homocysteine measurements were performed in Immulite® 2000. A concordance analysis was performed using Lin coefficient ( ) and MANOVA. **Results:** The measurement of homocysteine is highly reproducible ( = 0.908, 95% CI 0.861-0.955) and fasting or time before centrifugation does not affect its concentration. However, we found an average reduction of 14.2% (95% CI 8.4% to 20.0%) for the Hcy levels in samples obtained when the subjects were in supine position as compared to the levels in sitting position. **Conclusion:** Homocysteine levels are stable, when the blood samples remain without centrifugation, up to 24 hours at 4°C. However, body position of the participant at the time of sampling can affect Hcy levels. These findings highlight the role of biobanks in standardizing, handling and storing biological samples with excellence criteria. [Serrano NC, Páez MC, Bautista PK, Díaz-Martínez LA, Guío E. Pre-analytical variables that affect homocysteine concentrations: Applications for research biobanks. MedUNAB 2013; 16(2):59-64].

**Keywords:** Homocysteine, Quality control, Standards, Reference standards, Pre-analytical variables, Biobank.

\* Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB, Bucaramanga, Colombia.

§ Fundación Cardiovascular de Colombia FCV, Bucaramanga, Colombia,

¶ Universidad Industrial de Santander, UIS, Bucaramanga, Colombia.

**Correspondencia:** Elizabeth Guío Mahecha, Centro de Investigaciones Biomédicas UNAB, Calle 157 # 19-55, (Cañaveral Parque) Floridablanca, Colombia. E-mail: eguio@unab.edu.co

Investigación financiada por la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB, Código I-12061 y CARDIECOL (Conocimiento y acción para reducir la dimensión de la enfermedad cardiovascular en Colombia), Colciencias Código 5020-53-731809.

Artículo recibido: 2 de Julio de 2013, Aceptado: 20 de Noviembre de 2013.

## Introducción

Los biobancos con fines de investigación se han convertido en una herramienta importante e indispensable en la era de la investigación traslacional y la medicina personalizada.<sup>1</sup> Hace tan solo una década, los biobancos eran simplemente depósitos de muestras biológicas, con algunos datos clínicos asociados y con escasos procedimientos de calidad que garantizaran que las muestras pudieran ser usadas en el futuro con alguna certeza de obtener resultados válidos.

La tendencia actual de realizar estudios poblacionales, multicéntricos, que involucren un gran número de pacientes, conlleva a que los biobancos almacenen gran cantidad, tanto de material biológico humano (MBH), como de datos asociados al paciente y derivados de sus análisis. Tanto las muestras como los datos que ingresan al biobanco deben ser tomados, almacenados, gestionados y analizados mediante estándares de calidad definidos, que permitan finalmente obtener resultados de investigación válidos y reproducibles.<sup>1-3</sup>

Uno de los grandes retos que deben enfrentar los biobancos con fines de investigación es el aseguramiento de la calidad del MBH, para lo cual se requiere la estandarización de procesos de toma, manipulación y almacenamiento a largo plazo, así como el análisis de trazabilidad.<sup>4</sup> En este contexto la fase pre-analítica se convierte en uno de los mayores desafíos que enfrentan los biobancos, dado que es la parte más crítica del proceso analítico total. Para efectos de investigación en las cuales se utilizan muestras procedentes de un biobanco, el proceso de pre-analítica se convierte en un factor crítico que si no está debidamente controlado haría que, incluso, los mejores diseños de estudio, los operarios más expertos y la instrumentación más sofisticada fueran de poca utilidad si los procedimientos de toma y manipulación de muestras antes de su análisis no se encuentran estandarizados.<sup>4,5</sup>

Si bien el biobanco no siempre es el encargado de realizar la toma de muestras, sí es responsable de orientar al investigador en el protocolo adecuado para su ejecución. Lo anterior con el objetivo de garantizar la reproducibilidad en los resultados cuando se investigan en biomarcadores asociados a patologías específicas, y que generalmente son abordados por estudios observacionales multicéntricos a gran escala, donde el control de las variables pre-analíticas durante la toma y procesamiento inicial de las muestras es de trascendental importancia en el logro de una óptima especificidad de las pruebas de laboratorio.<sup>3,6,7</sup>

El impacto de las variables pre-analíticas sobre la estabilidad de las muestras almacenadas en el biobanco, en especial suero y plasma, puede ser calculado por medio de la medición de analitos bioquímicos comúnmente utilizados en pruebas de laboratorio clínico, en las cuales es posible evaluar efectos de las variables tales como: tiempo entre toma de muestra, centrifugación y fraccionamiento de

componentes, temperatura de almacenamiento temporal (ambiente vs refrigerada) y definitivo (rango de congelación), tiempo de almacenamiento, ciclos de congelación y descongelación, entre otros.<sup>8-10</sup>

Hasta la fecha, varias publicaciones han proporcionado información sobre la estabilidad de componentes sanguíneos, utilizando el análisis de marcadores de rutina del laboratorio clínico, pero pocos han investigado analitos utilizados con fines de investigación y bajo condiciones inherentes a la logística de los estudios multicéntricos.<sup>7,11,12</sup>

Durante las últimas cuatro décadas las anomalías en el ciclo de la homocisteína metionina asociado al metabolismo del ácido fólico han alcanzado un gran interés debido a la relación encontrada entre la elevación de los niveles de homocisteína en plasma, hiperhomocisteinemia (Hhcy), como factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular y neurovascular.<sup>13</sup>

Los niveles de homocisteína (Hcy) son sensibles a varias condiciones, entre ellas, el metabolismo sostenido de los glóbulos rojos que se produce al momento de la toma de la muestra, el cual puede aumentar de forma espuria los niveles séricos de Hcy hasta en un 10% por hora.<sup>14-16</sup> Otra condición pre-analítica importante, es la posición del paciente al momento de la toma. Se ha descrito que después de permanecer en posición supina durante 30 minutos, los niveles de Hcy de un individuo disminuyen entre 10 y 30%.<sup>17,18</sup> Por otra parte, a pesar de ser la Hcy un aminoácido no esencial, una dieta rica en proteínas con altas concentraciones de metionina, aminoácido precursor de la Hcy, podrían incrementar los niveles circulantes de Hcy. Guttormsen et al reportaron que 6-8 h después de la ingesta de una comida con aproximadamente 50 gr de proteína se produce un incremento en los niveles circulantes de Hcy,<sup>19</sup> de ahí la importancia de establecer el tiempo de ayuno transcurrido y la toma de la muestra.<sup>20</sup>

El presente estudio examinó el efecto de algunas condiciones pre-analíticas, que incluyeron, posición del individuo durante la toma de la muestra (sentado vs decúbito supino), el intervalo de tiempo transcurrido entre toma de la muestra y su centrifugación, y la ingesta de alimentos (ayuno vs postprandial) sobre los niveles en suero de Hcy.

## Metodología

**Diseño del estudio.** Se evaluó la estabilidad de la Hcy en muestras de suero de diez voluntarios auto-declarados como sanos, 6 mujeres, 4 hombres, con un rango de edad entre 18 y 45 años. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado previo a la toma de muestras. El protocolo de investigación y consentimiento informado aplicados fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB.

**Tabla 1.** Toma de muestra y tiempo de separación de componentes

Momentos para la toma de muestra	N° de tubo recolectado	Tiempo entre toma y centrifugación
<b>Primera</b> Día 1: Ayuno de 8 horas + posición sentado	1	30 min
	2	2 h
	3	6 h
	4	12 h
	5	24 h
<b>Segunda</b> Día 1: 4 horas después del almuerzo + posición sentado	6	30 min
<b>Tercera</b> Día 2: Ayuno de 8 horas + posición supina	7	30 min

Se seleccionaron tres variables pre-analíticas: 1) tiempo de ayuno, 2) posición del participante a la toma de muestra de sangre y 3) tiempo entre la toma de muestra y su centrifugación. Las variables 1 y 3 fueron seleccionadas porque son las que afectan los niveles de un alto porcentaje de analitos en el área de diagnóstico clínico, la 2 para evaluar el posible efecto de variación entre participantes de estudios ambulatorios y paciente hospitalizados, que conllevan a valores atípicos en la fase analítica.<sup>21</sup> Para evaluar estos tres parámetros, en cada participante se hicieron tres tomas de muestra de sangre periférica por medio de punción venosa antecubital usando tubos sin anticoagulante Vacutainer® de 7 mL (Becton Dickinson, USA; Ref #366431), (Tabla 1). Para la primera toma de muestra, todos los participantes se encontraban en ayuno mínimo de ocho horas y sentados. Se recolectó aproximadamente 35 mL de sangre por persona, en 5 tubos, los cuales fueron almacenados temporalmente a 4°C. Para evaluar el efecto del tiempo entre la toma de muestra y su centrifugación cada uno de los cinco tubos fue centrifugado a 3,000 rpm por 10 minutos (min), a diferentes tiempos: 30 min, 2 horas (h), 6 h, 12 h y 24 h. El suero obtenido de cada uno de los tubos fue transferido a viales en fracciones de 300 µL y almacenado en el biobanco a -80 °C hasta el momento del análisis definitivo. La segunda toma de muestra se realizó 4 h posterior al almuerzo y se extrajo aproximadamente 7 mL de sangre a cada persona en posición sentado. El tubo correspondiente a esta segunda toma fue centrifugado a los 30 min de la toma y almacenado según las condiciones ya descritas.

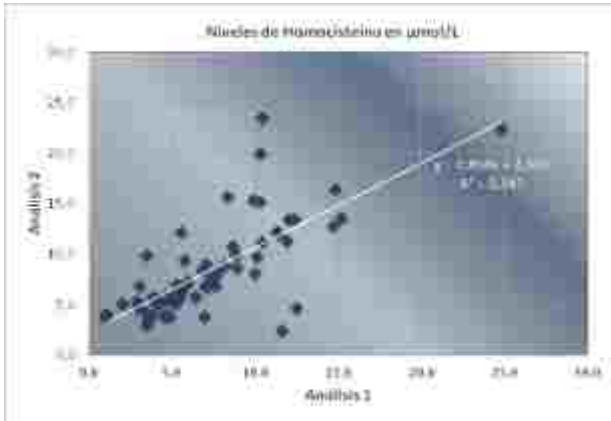
Al día siguiente todos los participantes, en ayuno mínimo de ocho horas, fueron ubicados en una camilla cómoda en posición decúbito supino por 30 min, posterior a ese tiempo

se procedió a tomar aproximadamente 7 mL de sangre, este tubo fue centrifugado a los 30 min, fraccionado y almacenada a -80°C. Partiendo de la existencia de estudios previos que cuantificaron Hcy en plasma, también se exploró en un subgrupo la reproducibilidad y concordancia de dicha cuantificación entre suero y plasma, con muestras almacenadas en el Biobanco del estudio observacional GenPE (Genética en Pre-eclampsia [www.genpe.org](http://www.genpe.org)), que incluyó 25 casos con pre-eclampsia (PE) y 24 controles, gestantes normotensas.

La cuantificación de Hcy se realizó por duplicado con el método inmunoensayo competitivo (Siemens, UK) en Immulite® 2000. Todos los sueros fueron cuantificados en un solo momento. El tiempo transcurrido entre la congelación a -80°C y la cuantificación de Hcy fue de 14 días.

**Análisis estadístico:** Los valores de Hcys tuvieron una distribución normal, por lo cual, todas las mediciones por duplicado se compararon por medio de la prueba t pareada,<sup>22</sup> con la prueba de Lin para estimar la concordancia más allá del azar de medidas continuas<sup>23</sup> y la concordancia entre las diferentes mediciones de acuerdo de Bland y Altman.<sup>24</sup> Para las comparaciones, ayuno vs postprandial, decúbito supino vs sentado y de los tiempos de centrifugación se utilizó el valor de la primera medición.

La evaluación de las variaciones entre ayuno y postprandial, entre posición decúbito supino versus sentado, y el subgrupo del estudio observacional (plasma vs. suero), se realizó de la misma manera que para la reproducibilidad de las alícuotas, incluyendo la diferencia absoluta y relativa junto con sus intervalos de confianza (IC) del 95%. La



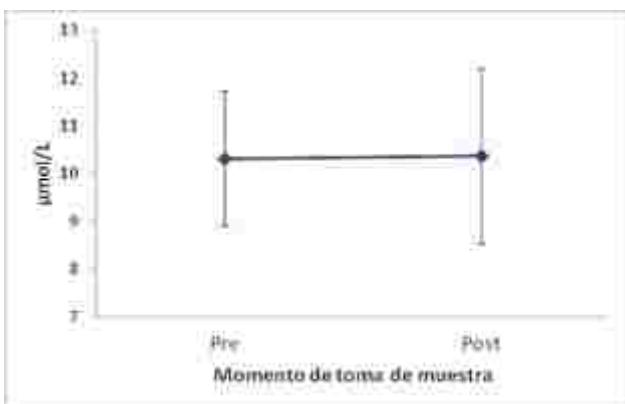
**Figura 1.** Análisis de correlación entre los niveles de homocisteína expresados en  $\mu\text{mol/L}$  y cuantificados por duplicado.

evaluación de la variación dada por el tiempo transcurrido entre la toma y la centrifugación de la muestra, se hizo por medio de análisis múltiple de varianza (MANOVA) teniendo en cuenta el fenómeno de las medidas repetidas.<sup>25</sup>

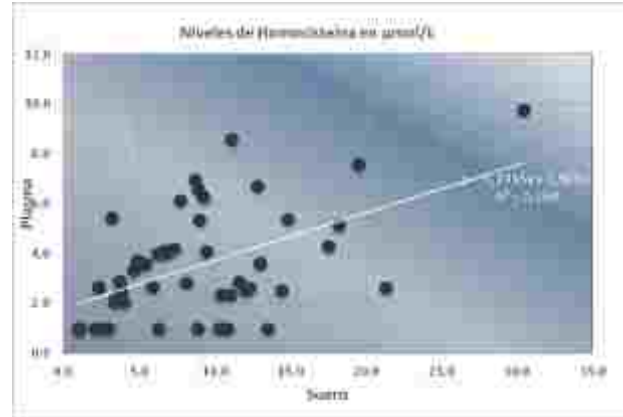
Todas las evaluaciones se realizaron con Stata SE 10.1 (StataCorp, College Station, USA, 2010) y se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad de cometer el error tipo I ( $\alpha$ ) era inferior a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

**Reproducibilidad:** El valor medio de Hcy de la primera medición de todas las alícuotas ( $n=54$ ) fue de 10.12 [desviación estándar (DE) 2.17  $\mu\text{mol/L}$ ], mientras que el de la segunda medición fue de 10.18 (DE 2.34)  $\mu\text{mol/L}$ , estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $t=0.417$ , 53 gl,  $p=0.678$ ). El coeficiente de Lin ( $r=0.908$ , IC95% 0.861 a 0.955) indica que la correlación entre ambas mediciones es excelente, sin que hayan discrepancias a lo largo del rango de niveles medidos según la evaluación de los límites de acuerdo de Bland y Altman (Figura 1).



**Figura 3.** Efecto de la ingesta de alimentos sobre los niveles de homocisteína.

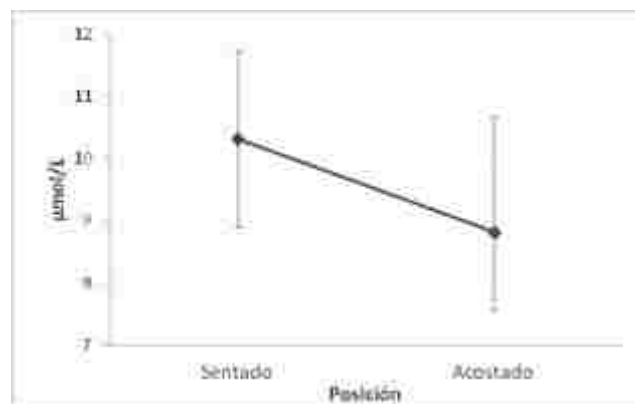


**Figura 2.** Análisis de correlación entre los niveles de homocisteína expresados en  $\mu\text{mol/L}$  y cuantificados en suero y plasma.

Para el subgrupo del estudio observacional en pre-eclampsia, se evidenció una mayor proporción detectable de muestras en suero (48/49) que en plasma (40/49), con un coeficiente de correlación bajo entre los dos componentes ( $R^2: 0.268$ ,  $Rho: 0.198$ ) (Figura 2).

**Efecto de la ingesta de alimentos sobre los niveles de homocisteína.** El promedio de Hcy en ayuno entre los nueve participantes que completaron esta fase fue de 10.60 (DE 2.22)  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que luego del almuerzo fue de 10.38 (DE 2.82)  $\mu\text{mol/L}$ , diferencia que no es estadísticamente significativa ( $t=0.369$ , 8 gl,  $p=0.722$ ); el coeficiente de Lin indica una razonable correspondencia entre los dos valores ( $r=0.743$ , IC95% 0.256 a 0.929), sin discrepancias en el espectro de la medición (figura 3).

**Variación de los niveles según la posición del participante al momento de la venopunción.** El promedio de Hcy en posición sentada entre las diez personas que participaron fue de 10.32 (DE 2.28)  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que entre ellas mismas pero en posición decúbito supino fue de 8.82 (DE 2.02)  $\mu\text{mol/L}$ , diferencia que es estadísticamente significativa ( $t=4.28$ , 9 gl,  $p=0.002$ ). Las mediciones cuando la muestra se tomó en decúbito fueron inferiores a



**Figura 4.** Variación de los niveles de homocisteína según la posición al momento de la venopunción.

las halladas cuando se tomó la muestra en posición sentada. El coeficiente de Lin indica una correspondencia intermedia entre los dos valores ( $r = 0.682$ , IC95% 0.402 a 0.962), sin que la discrepancia a favor de la toma en posición sentada fuera diferente en el espectro de la medición. La diferencia promedio de Hcy fue de 1.50 (DE 1.12)  $\mu\text{mol/L}$ , lo que equivale a una disminución de los niveles de 14.2% (IC95% 8.4% a 20.0%) (Figura 4).

**Efecto del tiempo transcurrido entre la toma y la centrifugación:** Nueve individuos culminaron esta etapa, los resultados se presentan en la figura 5. El promedio del nivel de Hcy de las muestras centrifugadas a los 30 min de la toma fue de 10.60 (DE 2.22)  $\mu\text{mol/L}$ , a las 2 h fue de 9.16 (DE 2.26)  $\mu\text{mol/L}$ ; a las 6 horas de 10.26 (DE 1.57)  $\mu\text{mol/L}$ ; a las 12 h 10.63 (DE 2.12)  $\mu\text{mol/L}$ ; y a las 24 h de 10.82 (DE 1.72)  $\mu\text{mol/L}$ . Estas diferencias no son significativas en el análisis multivariado de varianza ( $F=1.25$ , 53 gl,  $p=0.393$ ), aún después de ajustar por medidas repetidas en el mismo sujeto ( $F=1.19$ , 4 gl,  $p=0.385$ ).

## Discusión

Las condiciones pre-analíticas son parte esencial y a menudo subestimada en el diseño de estudios de investigación que incluyen el análisis de biomarcadores. Se deben implementar instrucciones precisas con respecto a la toma de muestra, manipulación de las muestras de sangre total y el intervalo máximo de tiempo permitido antes de la separación del plasma o suero, para lograr obtener resultados válidos. Se conoce que la separación inmediata proporciona una estabilidad óptima del analito a analizar.<sup>26</sup> Sin embargo, en los estudios poblaciones multicéntricos, los equipos de laboratorio, a menudo, no están disponibles de inmediato en donde se extrae la sangre (por ejemplo, una clínica ambulatoria o una sala de cirugía o de parto). Por lo tanto, el protocolo de estudio encierra a menudo un retraso predefinido antes de la centrifugación de muestras de sangre total, que pueden variar o ser prolongadas en casos ocasionales. Todas estas variables deben ser registradas y trabajar con protocolos o procedimientos normalizados estrictos que minimicen la posibilidad de errores aleatorios en la fase pre-analítica que en gran medida puede afectar la calidad de la muestra individual y la posterior interpretación de los resultados.

En el presente estudio se encontró que la medición de Hcy es altamente reproducible y que los niveles de Hcy no cambian significativamente cuando son medidos en ayuno o después de ingerir alimentos. Al evaluar el efecto de la posición del individuo al momento de la venopunción encontramos una reducción promedio del 14.2% en los niveles de Hcy cuando las muestras fueron tomadas en posición de cubito supino, reducción que es estadísticamente significativa ( $p=0.002$ ). No encontramos diferencias significativas en los niveles de Hcy medidos en muestras centrifugadas después de 30 min, 2, 6, 12 o 24 h de almacenamiento temporal a 4°C.

Se ha reportado que los niveles séricos de Hcy pueden variar dependiendo de la ingesta de alimentos, en especial, de proteínas.<sup>19</sup> El presente estudio no encontró diferencias significativas en los niveles séricos de Hcy entre el estado de ayuno de 8 horas y el estado postprandial. La diferencia promedio entre las dos mediciones fue de 0.22  $\mu\text{mol/L}$ . Sin embargo, vale la pena resaltar que nosotros no evaluamos la cantidad ni la calidad de las proteínas ingeridas por los participantes.

La posición del individuo al momento de la extracción de sangre tuvo un efecto significativo en los niveles séricos de Hcy, los cuales son menores si la muestra es tomada 30 min posterior a permanecer en decúbito supino, comparado con los niveles séricos cuando la muestra es tomada en posición sentada. Una posibilidad que puede explicar la disminución en los niveles séricos de Hcy con el cambio de posición, es la unión de la Hcy a proteínas, más del 80% de Hcy total que circula en el plasma se encuentra ligada a proteínas, principalmente a la albúmina por medio de puentes disulfuro.<sup>27-29</sup> Además, se ha reportado que los cambios de postura podrían influir sobre los componentes sanguíneos por la redistribución de líquidos entre los espacios intravascular y extravascular.<sup>30,31</sup> Para confirmar esta hipótesis se requiere cuantificar Hcy libre vs unida a proteínas, lo cual no estuvo dentro del alcance del presente reporte.

La disminución significativa del 14,2% en los niveles de Hcy en muestras obtenidas después de que los participantes permanecieran tan solo 30 min en posición decúbito supino, indicando que la posición del individuo durante la venopunción afecta los resultados de este biomarcador, resalta la importancia de establecer protocolos estandarizados para la toma de muestras, los cuales deben ajustarse al tipo de participantes o pacientes (hospitalizados versus ambulatorios).

No encontramos diferencias significativas con respecto al tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la separación de componentes. Las diferencias encontradas en el promedio de las concentraciones están entre 1.1 a 1.66  $\mu\text{mol/L}$ , variaciones que no son estadísticamente significativas. La estabilidad de Hcy en sangre total es dependiente del tiempo, pero en especial de la temperatura de almacenamiento temporal. Esto fue demostrado por los resultados de Fiskestrand et al,<sup>14</sup> quienes encontraron que cuando la sangre total permanece a 22°C por 4 horas se produce un incremento considerable (20%) en las concentraciones de Hcy. Sin embargo, cuando la sangre es puesta en hielo, los niveles de Hcy permanecen constantes por 4 h y su aumento es moderado (7%) a las 24 h. Resultados similares fueron reportados por Clark et al,<sup>32</sup> quienes encontraron que a 21°C, hay un incremento del 37% a las 24 h, versus un incremento tan solo del 4.6% a las 24 h si la muestra es almacenada a 4°C. Nuestros resultados confirman que los niveles de Hcy son estables hasta por 24 h posteriores a la toma de muestra, si se controlan las condiciones de temperatura, para el presente estudio las muestras fueron almacenadas a 4°C.

Los efectos de otras variables pre-analíticas que puedan afectar los niveles séricos de Hcy tales como: tubo recolector, ciclos de congelación-descongelación y almacenamiento por prolongados periodos de tiempo, deberían ser consideradas en nuevos estudios.

## Conclusiones

El presente estudio sugiere que la Hcy sérica es estable hasta 24 horas cuando la muestra es conservada a 4°C, que el estado de ayuno o postprandial no influye significativamente sobre los niveles séricos de Hcy y que se debe estandarizar la posición del individuo al momento de la venopunción. Estas recomendaciones pueden ser útiles para los investigadores en la planificación y evaluación de los estudios.

## Conflicto de intereses

Los autores del presente declaran no tener conflictos de intereses, sea de tipo comercial, académico o personal.

## Referencias

1. Collyar DE. Biospecimens and People: A Fundamental Connection. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2011; (42):41-42.
2. Liaño F, Torres AM. Biobancos: una nueva herramienta para la investigación clínica. *Nefrología*. 2009; 29(3):193-195.
3. Asslaber M, Zatloukal K. Biobanks: transnational, European and global networks. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2007; 6(3): 193-20.
4. Simundic AM, Lippi G. Preanalytical phase-a continuous challenge for laboratory professionals. *Biochem Med*. 2012; 22:145-9.
5. Oleko A, Betsou F, Sarter H, Gerdil C, Desbois I, Charles MA, Leridon H, Vandentorren S. A Pilot Study of the ELFE Longitudinal Cohort: Feasibility and Preliminary Evaluation of Biological Collection. *Biopreserv Biobank*. 2011 Sep; 9(3):223-227.
6. Elliott P, Peakman TC; UK Biobank. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol*. 2008 Apr; 37(2):234-44.
7. Barton RH, Nicholson JK, Elliott P, Holmes E. High-throughput 1H NMR-based metabolic analysis of human serum and urine for large-scale epidemiological studies: validation study. *Int J Epidemiol*. 2008 Apr; 37 Suppl 1:i31-40.
8. van Eijsden M1, van der Wal MF, Hornstra G, Bonsel GJ. Can whole-blood samples be stored over 24 hours without compromising stability of C-reactive protein, retinol, ferritin, folic acid, and fatty acids in epidemiologic research? *Clin Chem*. 2005; 51:230-232.
9. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, et al. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res*. 2003; 543:217-234.
10. Mitchell BL, Yasui Y, Li CI, et al. Impact of freeze-thaw cycles and storage time on plasma samples used in mass spectrometry based biomarker discovery projects. *Cancer Inform*. 2005; 1:98-104.
11. Schrohl AS, Wurtz S, Kohn E, et al. Banking of biological fluids for studies of disease-associated protein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7:2061-2066.
12. Yin P1, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, Lucio M, Zell A, Häring HU, Xu G, Lehmann R. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem*. 2013 May; 59(5):833-45. doi: 10.1373/clinchem.2012.199257.
13. Beard RS Jr, Bearden SE. Vascular complications of cystathionine  $\gamma$ -synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Jan; 300(1):H13-26.
14. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem*. 1993; 39:263-71.
15. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin Chem* 1992; 38:1311-5.
16. Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1991; 29:549-54.
17. Rasmussen K, Møller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem*. 2000; 37:627-48.
18. Thirup P, Ekelund S. Day-to-day, postprandial, and orthostatic variation of total plasma homocysteine. *Clin Chem*. 1999; 45:1280-3.
19. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr*. 1994; 124:1934-41.
20. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem*. 2004; 50:3-32.
21. Carraro P1, Zago T, Plebani M. Exploring the initial steps of the testing process: frequency and nature of pre-analytical errors. *Clin Chem*. 2012 Mar; 58(3):638-42.
22. De Muth JE. Overview of biostatistics used in clinical research. *Am J Health Syst Pharm*. 2009; 1:70-81.
23. Lin LI-K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*. 1989; 45:255-68.
24. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986; 1:307-10.
25. Everitt BS. Analysis of longitudinal data. *Beyond MANOVA*. *Br J Psychiatry*. 1998; 142:7-10.
26. Boyanton BL Jr1, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem*. 2002 Dec; 48(12):2242-7.
27. Sengupta S, Chen H, Togawa T, DiBello PM, Majors AK, Büdy B et al. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem*. 2001; 276:30111-7.
28. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem*. 1985; 31:624-8.
29. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status [Editorial]. *Clin Chem*. 1995; 41:340-2.
30. Inagaki H, Kuroda M, Watanabe S, Hamazaki T. Changes in major blood components after adopting the supine position during haemodialysis. *Nephrol Dial transplant*. 2001; 16:798-802.
31. Maw GJ, Mackenzie IL, Taylor NA. Redistribution of body fluids during postural manipulations [Abstract]. *Acta Physiol Scand*. 1995; 155:157-63.
32. Clark S, Youngman LD, Sullivan J, Peto R, Collins R. Stabilization of homocysteine in unseparated blood over several days: a solution for epidemiological studies. *Clin Chem*. 2003; 49:518-20.