

# Подходы к автоматизации преаналитического этапа крупномасштабных научных исследований в биобанке ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России

Покровская М. С., Борисова А. Л., Кондрацкая В. А., Ефимова И. А., Ершова А. И., Драпкина О. М.

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России. Москва, Россия

**Цель.** Создание и валидация алгоритма автоматического аликвотирования образцов сыворотки и плазмы крови для биобанкирования в рамках широкомасштабного научного исследования.

**Материал и методы.** Биобанк НМИЦ ТПМ оснащен системой автоматического аликвотирования марки Tecan. При составлении программы аликвотирования (скрипта) подбирали следующие параметры: время, затрачиваемое на раскапывание одного полного криоштатива, вместимостью 96 криопробирок, оптимальное количество вакутейнеров и наконечников при однократной загрузке прибора. Программу создавали для получения за один цикл загрузки прибора от 8-ми участников суммарно от каждого по 12 аликвот объемом 0,5 мл сыворотки крови, плазмы с этилендиаминтетрауксусной кислотой и плазмы с цитратом натрия в криопробирках на 1 мл. Проводили сравнительную оценку автоматического и ручного раскапывания по параметрам времени, затраченного на пробоподготовку, и качества получаемых аликвот.

**Результаты.** Разработана и валидирована методика проведения преаналитического этапа крупномасштабного научного исследования, основанная на автоматизации процесса аликвотирования биообразцов, созданы скрипты для аликвотирования сыворотки и плазмы крови на автоматизированной станции Tecan Freedom EVO. Эксперимент, проведенный на биоматериале от 64 участников, показал, что при ожидаемом потоке в 32 участника в день для раскапывания в ручном режиме требовалось >2 ч, а при автоматическом (4 запуска робота-аликвотера по 24 вакутейнера от 8-ми участников) <1,5 ч при полном исключении ошибок, связанных с влиянием человеческого фактора.

**Заключение.** Автоматическое раскапывание имеет ряд преимуществ в сравнении с ручным: позволяет гарантировать стандартизацию и эффективность проведения пробоподготовки, сократить время и увеличить точность аликвотирования биомате-

риала, сэкономить место в морозильных камерах длительного хранения, благодаря использованию криопробирок меньшего объема. Разработанный алгоритм написания программ аликвотирования и проведения расчетов оптимального использования расходных материалов может быть использован и в других проектах.

**Ключевые слова:** биобанк, биобанкирование, автоматическое аликвотирование, криопробирки, сыворотка крови, плазма крови, программа, робот-аликвотер, автоматический раскапыватель, биообразцы, автоматизация биобанка, автоматизированная станция.

**Отношения и деятельность:** нет.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность Александру Лосковичу, руководителю направления "Молекулярная генетика и автоматизация" ООО "Квадрос-Био" за техническую поддержку и консультативную помощь.

Поступила 09/09-2022

Рецензия получена 17/10-2022

Принята к публикации 23/10-2022



**Для цитирования:** Покровская М. С., Борисова А. Л., Кондрацкая В. А., Ефимова И. А., Ершова А. И., Драпкина О. М. Подходы к автоматизации преаналитического этапа крупномасштабных научных исследований в биобанке ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(11):3404. doi:10.15829/1728-8800-2022-3404. EDN NZXXFL

## Approaches to automation of the preanalytical phase of large-scale research in the biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of Russia

Pokrovskaya M. S., Borisova A. L., Kondratskaya V. A., Efimova I. A., Ershova A. I., Drapkina O. M.

National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

**Aim.** To create and validate an algorithm for automatic aliquoting of serum and plasma samples for biobanking as part of a large-scale study.

**Material and methods.** Biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine is equipped with a Tecan

automated aliquoting system. When compiling the aliquoting program (script), the following parameters were selected: the time spent on spotting one complete cryobox, with a capacity of 96 cryotubes, the optimal number of vacutainers and tips for a single loading of the

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: mpokrovskaya@gnicpm.ru

[Покровская М. С.\* — к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0001-6985-7131, Борисова А. Л. — ведущий инженер лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0003-4020-6647, Кондрацкая В. А. — м.н.с. лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0002-3843-6980, Ефимова И. А. — ведущий эксперт лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0002-3081-8415, Ершова А. И. — д.м.н., руководитель лаборатории клинической, зам. директора по фундаментальной науке, ORCID: 0000-0001-7989-0760, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

device. The program was created to receive 12 aliquots of 0,5 ml of blood serum, plasma with ethylenediaminetetraacetic acid and plasma with sodium citrate in cryotubes per 1 ml from eight participants in total from each in one cycle of device loading. Automatic and manual spotting was assessed in terms of the time spent on sample preparation and the quality of the aliquots obtained.

**Results.** A methodology for conducting the preanalytical phase of a large-scale study based on the automation of biosample aliquoting has been developed and validated. We created scripts for aliquoting serum and blood plasma at the automated Tecan Freedom EVO system. An experiment conducted on biomaterial from 64 participants showed, that with an expected flow of 32 participants per day, it took more than 2 hours for manual aliquoting, and for automatic aliquoting (4 launches of the aliquot robot for 24 vacutainers from 8 participants) — less than 1,5 hours with the complete exclusion of human errors.

**Conclusion.** Automated aliquoting has a following number of advantages in comparison with manual: it allows to guarantee standardization and efficiency of sample preparation, reduce the time and increase the accuracy of aliquoting of biomaterial, save space in long-term storage freezers due to the use of smaller cryotubes. The developed algorithm for creating aliquoting programs and calculating the optimal use of consumables can be used in other projects.

**Keywords:** biobank, biobanking, automatic aliquoting, cryotubes, blood serum, blood plasma, program, robot aliquoter, automatic aliquoter, biosamples, biobank automation.

**Relationships and Activities:** none.

**Acknowledgments.** The authors are grateful to Alexander Loskovich, Head of the Molecular Genetics and Automation Department at OOO Qvados-Bio, for technical support and advisory assistance.

Pokrovskaya M. S.\* ORCID: 0000-0001-6985-7131, Borisova A. L. ORCID: 0000-0003-4020-6647, Kondratskaya V. A. ORCID: 0000-0002-3843-6980, Efimova I. A. ORCID: 0000-0002-3081-8415, Ershova A. I. ORCID: 0000-0001-7989-0760, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

\*Corresponding author: mpokrovskaya@gnicpm.ru

**Received:** 09/09-2022

**Revision Received:** 17/10-2022

**Accepted:** 23/10-2022

**For citation:** Pokrovskaya M. S., Borisova A. L., Kondratskaya V. A., Efimova I. A., Ershova A. I., Drapkina O. M. Approaches to automation of the preanalytical phase of large-scale research in the biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of Russia. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(11):3404. doi:10.15829/1728-8800-2022-3404. EDN NZXXFL

ПО — программное обеспечение, СОП — стандартная операционная процедура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

### Ключевые моменты

#### Что известно о предмете исследования?

- Автоматизированные станции аликвотирования применяются при проведении преаналитического и аналитического этапов исследований: аликвотировании жидких биообразцов, выделении дезоксирибонуклеиновой кислоты/рибонуклеиновой кислоты, постановке полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и др.
- Применение автоматизированных систем аликвотирования повышает точность и сокращает время пробоподготовки.

#### Что добавляют результаты исследования?

- Разработана и валидирована методика проведения преаналитического этапа научного исследования, основанная на автоматизации процесса аликвотирования биообразцов сыворотки и плазмы крови.
- Созданы скрипты для аликвотирования сыворотки и плазмы крови по заданным параметрам на автоматизированной станции Tecan Freedom EVO.
- Разработанный алгоритм написания программ аликвотирования и проведения расчетов оптимального использования расходных материалов является основой для использования в других проектах.

### Key messages

#### What is already known about the subject?

- Automated aliquoting systems are used during the preanalytical and analytical phases of research: aliquoting of liquid biosamples, isolation of deoxyribonucleic acid/ribonucleic acid, polymerase chain reaction, enzyme immunoassay, etc.
- The use of automated aliquoting systems improves accuracy and reduces sample preparation time.

#### What might this study add?

- We developed and validated a methodology for conducting the preanalytical research phase, based on the automation of serum and blood plasma biosample aliquoting.
- We created scripts for aliquoting serum and plasma according to specified parameters at the automated Tecan Freedom EVO system.
- The developed algorithm for writing programs for aliquoting and performing calculations for the optimal use of consumables is the basis for use in other projects.

## Введение

С каждым годом биобанкирование играет все более важную роль в развитии современных биомедицинских технологий и проведении научно-исследовательских работ, обеспечивая исследователей биоматериалом надлежащего качества в необходимом количестве. Одним из подходов, позволяющих гарантировать соблюдение регламента проведения пробоподготовки биообразцов и при этом минимизировать количество ошибок, связанных с влиянием человеческого фактора, является оснащение биобанков автоматическими роботизированными станциями, предназначенными для раскапывания жидких биообразцов (аликвотирования). Универсальность автоматизированных систем аликвотирования позволяет использовать их в работе с различными типами образцов биологических жидкостей в условиях, когда аликвотирование требует высокой точности [1]. Автоматизированные станции при снабжении их соответствующими модулями могут широко применяться при выделении дезоксирибонуклеиновой кислоты/рибонуклеиновой кислоты (ДНК/РНК), постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР), пробоподготовке для геномного секвенирования, проведении иммуноферментного анализа (ИФА), для посева жидких культур на чашки Петри, а также для выделения мононуклеарных клеток периферической крови [1-5].

Одной из наиболее широко используемых в биобанках станций является автоматизированная станция Freedom EVO марки Tecan — это модульная роботизированная платформа, осуществляющая дозирование жидких образцов и реагентов.

Биобанк ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России (далее — НМИЦ ТПМ), основанный в 2014г, непрерывно расширяется и требует усовершенствования способов обработки и хранения биологического материала. Растет количество и масштаб научных проектов, связанных с использованием биоматериала и технологий биобанкирования [6]. Одной из актуальных и наиболее крупных научно-исследовательских работ НМИЦ ТПМ с неотъемлемым участием биобанка является "Разработка интегрированных систем прогнозирования в персонализированной медицине". В рамках этого проекта запланирована разработка систем прогнозирования развития и прогрессирования хронических инфекционных заболеваний (артериальная гипертензия, атеросклероз и его осложнения, сердечная недостаточность, ожирение, неалкогольная жировая болезнь печени, сахарный диабет, онкологические заболевания и др.) на основании комплексного исследования клинических, омиксных данных и факторов внешней среды за счет анализа больших массивов данных, а также современных алгоритмов персонифицированного подхода к диагностике, лечению и профилактике редких и хронических не-

инфекционных заболеваний, включающего полноценный комплексный анализ потенциальной генетической предрасположенности.

Для реализации проекта будет создана коллекция биообразцов цельной крови, сыворотки и плазмы крови от пациентов, госпитализированных в НМИЦ ТПМ; для повышения репрезентативности выборки будет использован метод сплошного набора. Ключевой задачей проекта является создание обширной единой базы данных, совмещенной с электронной историей болезни и содержащей полную информацию об образцах и пациентах-участниках исследования (клинико-лабораторные, социально-демографические, поведенческие, психологические данные), в т.ч. динамичную информацию о клинических показателях и данные, полученные с помощью омиксных технологий с использованием сохраненных в биобанке биообразцов.

Проведение первого этапа исследования, предполагающего биобанкирование 60 тыс. аликвот сыворотки и плазмы крови от 5000 участников в течение 1,5 лет в рамках непрерывного сбора биоматериала, потребовало специальной подготовки. Для оптимизации хранения планируемого количества аликвот возникла потребность в использовании криопробирок объемом 1 мл. Использование таких криопробирок при ручном раскапывании образцов затруднено из-за их маленького размера (узкого горла), потому целесообразно применять автоматическое раскапывание с помощью робота-аликвотера. Кроме того, необходимость автоматизировать процесс аликвотирования образцов сыворотки и плазмы крови была продиктована планируемым большим ежедневным потоком биоматериала от участников исследования.

Биобанк НМИЦ ТПМ оснащен роботизированной станцией аликвотирования Tecan Freedom EVO 150. В рамках подготовки к проведению исследования было необходимо создать протокол автоматизированного аликвотирования биоматериала на роботе-аликвотере в соответствии с задачами научного проекта и валидировать разработанную методику путем проведения сравнительной оценки разработанного протокола с традиционным ручным методом обработки биообразцов. На начальном этапе были сформулированы требования, предъявляемые к разрабатываемой методике: исключение ошибок, связанных с влиянием человеческого фактора, сокращение времени аликвотирования, экономия места в морозильных камерах, получение биоматериала надлежащего качества.

Таким образом, целью настоящего исследования было создание и валидация алгоритма автоматического аликвотирования образцов сыворотки и плазмы крови для биобанкирования в рамках широкомасштабного научного исследования.

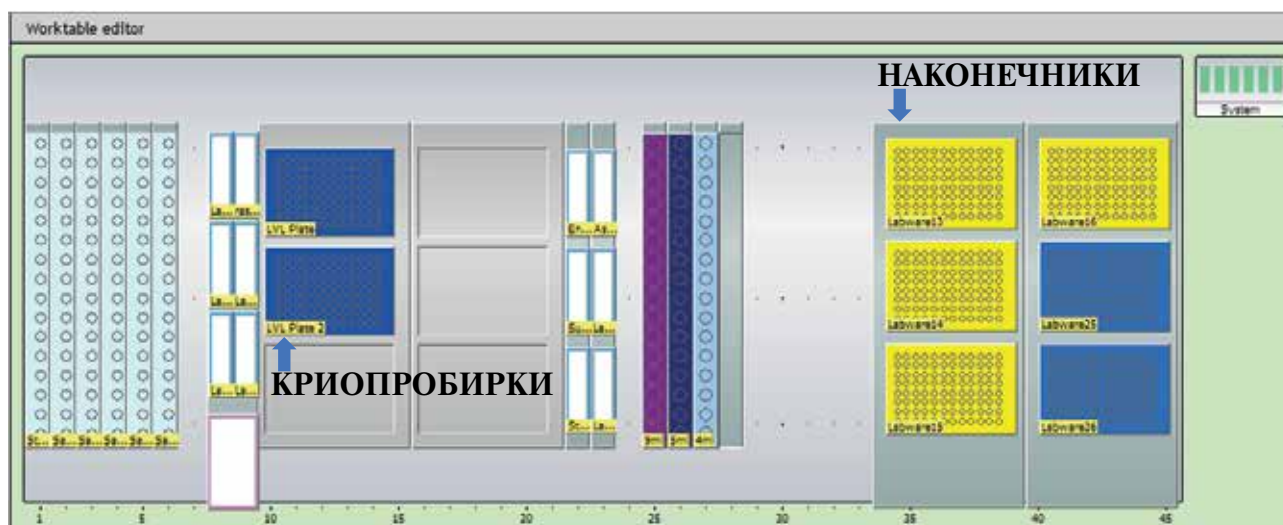


Рис. 1 Схема рабочего стола робота-аликвотера на экране компьютера.

## Материал и методы

Дизайн исследования в рамках научного проекта "Разработка интегрированных систем прогнозирования в персонализированной медицине" предполагает сбор образцов венозной крови в суммарном объеме 20,5 мл от каждого участника с целью получения и хранения образцов цельной крови, сыворотки и двух видов плазмы. В набор первичных пробирок включили: пробирку с цельной кровью с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) объемом 4 мл от каждого участника для генетических исследований (не аликвотируется), одну пробирку-вакутейнер с желтой крышечкой объемом 8 мл, для получения 6 аликвот сыворотки крови по 0,5 мл, одну пробирку с фиолетовой крышечкой объемом 4 мл для получения 3 аликвот плазмы-ЭДТА по 0,5 мл и одну пробирку с голубой крышечкой объемом 4,5 мл для получения 3 аликвот по 0,5 мл плазмы с цитратом натрия. Количество проб биоматериала для хранения от каждого участника было рассчитано таким образом, чтобы обеспечить возможность проведения в дальнейшем широкого спектра исследований на полученном биоматериале: исходя из вида и количества запланированных по проекту анализов и потенциальных будущих исследований, а также из необходимости соблюдения условия однократного использования биообразца без повторения циклов замораживания/оттаивания [7].

Стандартная пробоподготовка крови в рамках биобанкирования представляет собой последовательное выполнение следующих этапов: центрифугирование, аликвотирование, замораживание и внесение информации, ассоциированной с биообразцом, в базу данных биобанка. Перед центрифугированием первичные пробирки со взятой кровью для получения сыворотки выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, а для получения плазмы — <30 мин, затем центрифугируют в течение 15 мин при 4° С со скоростью 1900 g (3260 об./мин). После центрифугирования проводят визуальный контроль биоматериала на наличие гемолиза и хилеза. Качественные образцы раскапывают по аликвотам.

Автоматическое аликвотирование проводили на роботе-аликвотере. Автоматизированная станция аликвотирования в биобанке НМИЦ ТПМ представлена модульным рабочим столом Freedom EVO 150, оснащенным автоматическим пипетирующим манипулятором (LiHa) для 4 наконечников (с фильтром или без фильтра), системой анализа фракций TubeEye и сканером штрихкодов.

## Результаты и обсуждение

### 1. Создание протокола (программы, скрипта) автоматического аликвотирования

Дизайн запланированного исследования предполагает получение образцов крови от одного участника в 3 типа пробирок-вакутейнеров. Для отработки метода под каждый тип пробирок в специальном программном обеспечении (ПО) прибора EVOware Standart была написана индивидуальная программа аликвотирования. Чтобы обеспечить весь процесс автоматического аликвотирования, в программе последовательно описывали каждый шаг, который необходимо проделать роботу-аликвотеру, включая смену наконечников при переходе от одного типа биоматериала к другому. Программный интерфейс EVOware содержит: панель доступных команд для манипуляторов и встроенных устройств, библиотеки классов жидкостей, штативов и лабораторного пластика, а также области для создания протокола и виртуального рабочего стола. Написание рабочей программы начинают с конфигурации виртуального рабочего стола станции.

Перед написанием скрипта для каждого проекта необходимо провести калибровку всех используемых расходных материалов (штативы, наконечники, пробирки) и внести данные калибровки в память прибора, затем разместить их на виртуальном





Рис. 2 Интерфейс программы управления модулем для анализа фракций крови TubeEye.

рабочем столе в ПО робота-аликвотера (рисунок 1). Для этого в поле виртуального рабочего стола манипулятором "мышь" расставляют штативы и лабораторный пластик в соответствии с поставленной задачей. Фактическая конфигурация рабочего стола выстраивается в соответствии с виртуальной. Порядок расположения пробирок на виртуальном и реальном столах робота-аликвотера должны совпадать [8].

После создания виртуального рабочего стола приступают к написанию программы аликвотирования. При работе с жидкостями основными являются команды управления пипетирующим манипулятором (LiHa) по надеванию одноразовых наконечников (Get DiTi), забору жидкости (Aspirate), внесению жидкости (Dispense), сбросу наконечников (Drop DiTi). С помощью манипулятора "мышь" из панели доступных команд программного интерфейса EVOware Standart соответствующие команды переносятся в поле написания скрипта. При этом открывается диалоговое окно для задания дополнительных параметров, таких как количество используемых наконечников, необходимый объем, класс жидкости, позиция на виртуальном рабочем столе, параметры циклов и другие. Выполнение команд программы происходит последовательно — строка за строкой. Помимо этого, можно формировать циклы, которые содержат как одну строку команды, так и группы строк. Программирование в EVOware Standart устроено по принципу петель, т.е. для процесса "забора-аликвотирования" прописывается количество повторений, которое необходимо сде-

лать для раскапывания одной пробирки, и шаг (переход), который делает робот при смене пробирок [2]. В рамках планируемого проекта при создании "петли" для аликвотирования сыворотки было прописано 6 повторений, а для обоих типов плазмы — по 3, что соответствует количеству аликвот, которое необходимо получить, с шагом в один ряд криопробирок для смены наконечника. При запуске программы такие параметры, как количество образцов, объемы дозирования, временные интервалы и др. можно варьировать.

Важной составляющей корректного выполнения задач по аликвотированию и дозированию является правильное указание класса жидкости в поле дополнительных параметров [3]. В зависимости от указанного класса жидкости пипетирующий манипулятор определяет, как работать с тем или иным материалом. При выборе класса жидкости указываются также позиции наконечников при заборе и внесении жидкости, параметры детектирования уровня жидкости, скорости аспирации и внесения образца.

В рамках исследования для оптимального дозирования каждой жидкости были подобраны индивидуальные параметры. Поскольку прибор оснащен автоматическим дозатором для 4 наконечников, аликвотирование образцов проводилось одновременно из 4 первичных пробирок одного типа. Смену наконечников осуществляли после аликвотирования каждого вида биоматериала. Таким образом, за один запуск (полный цикл) получали последовательно аликвоты сыворотки от 4-х паци-

ентов-участников исследования, затем — плазмы с ЭДТА и плазмы с цитратом натрия.

Для того чтобы сыворотку и плазму крови алиquotировать в чистом виде, не захватывая клеточный осадок, использовали дополнительный модуль робота-алиquotера — камеру TubeEye, для которой в специальном ПО написали программу, позволяющую калибровать камеру и анализировать фракции в отцентрифугированных пробирках-вакутейнерах. При калибровке вакутейнеров для TubeEye учитывали количество фаз, высоту и диаметр пробирки. Камеру TubeEye откалибровывали таким образом, чтобы наконечник не опускался ниже 1 мм от фазы осадка в пробирках с плазмой крови и не захватывал слой лейкоцитарной пленки. В результате в ПО прибора были созданы профили для оценки фракций в пробирках разного объема. Интерфейс программы TubeEye представлен на рисунке 2. Розовая полоска маркирует разделение фаз.

Робот-алиquotер оснащен сканером штрихкодов. С использованием соответствующей команды в скрипте осуществляли автоматическое сканирование штрихкодов, нанесенных на первичные пробирки. QR-коды на дне криопробирок сканировали целым штативом на сканере IntelliCode, ПО которого создает экспортный файл с информацией о штрихкодах криопробирок и их расположении в штативе. Строка Export Data в программе алиquotера генерирует экспортный файл в формате CSV с полной информацией о том, из какой пробирки в какую перемещалась жидкость. Компиляция экспортных файлов является завершающим этапом выполнения программы алиquotирования, в результате чего в специальном формате создается файл, содержащий информацию о штрихкодах первичных пробирок, QR-кодах криопробирок, позиции криопробирок в штативе, типе и объеме образца для дальнейшего импорта в программу хранения FreezerPRO.

## **2. Автоматическое алиquotирование образцов крови в соответствии с написанной программой (скриптом)**

Подготовку биоматериала к автоматизированному алиquotированию сыворотки и плазмы крови проводили по стандартной методике, описанной в разделе "Материалы и методы". После центрифугирования пробирки-вакутейнеры с сывороткой и плазмой крови, предназначенные для автоматического алиquotирования, переносили в соответствующие стойки для первичных пробирок робота-алиquotера в точном соответствии с расположением на виртуальном столе в программе прибора. Штативы с криопробирками также расставляли на рабочем столе прибора в соответствии с виртуальной схемой. После сканирования штрихкодов первичных пробирок-вакутейнеров и криопробирок начинали алиquotирование в соответствии с написанной программой.

Для учета и дальнейшей идентификации образцов информацию о полученных аликвотах вносили в программу хранения данных, сопровождающих биообразцы, — FreezerPRO. Для загрузки данных в программу FreezerPRO использовали соответствующий проведенному запуску файл, сформированный прибором в формате CSV, в котором есть идентификационный номер пациента-участника исследования (штрихкод с первичных пробирок), штрихкоды криопробирок с полученными аликвотами, тип каждого образца, объем полученных аликвот, в который дополнительно вносили дату и время забора образца, время центрифугирования и заморозки. Также в загрузочном файле для FreezerPRO прописывали расположение штатива в морозильной камере (номер морозильника, полки, стеллажа и штрихкод штатива). После завершения цикла раскапывания готовые аликвоты сыворотки крови, плазмы с ЭДТА и плазмы с цитратом натрия размещали в морозильных камерах в соответствии с прописанным расположением в FreezerPRO и замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ , а цельную кровь — при температуре  $-30^{\circ}\text{C}$ .

## **3. Валидация и сравнение методов ручного и автоматизированного алиquotирования**

В соответствии с определением, представленным в стандарте ГОСТ Р ИСО 9000-2015, валидация — это подтверждение на основе представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены.

На первом этапе валидации метода было проведено 8 тестовых запусков прибора и, соответственно, полных циклов работы робота-алиquotера для 64 участников. Продолжительность одного цикла алиquotирования биообразцов от 8 участников по разработанной методике составила от 15 до 20 мин. Таким образом, было установлено, что подготовка и проведение автоматического раскапывания для 32 человек (ожидаемый ежедневный поток участников в исследовании), т.е. предварительная подготовка и 4 запуска робота-алиquotера, длится суммарно  $<1,5$  ч.

На втором этапе эксперимента сравнивали автоматизированный и ручной методы раскапывания. Для этого биоматериал от 64 участников разделили на две равных группы для дальнейшего алиquotирования. Пробирки-вакутейнеры с сывороткой и плазмой от 32 участников алиquotировали на роботе-алиquotере и параллельно начинали ручное раскапывание биообразцов второй группы. Эксперимент показал, что при раскапывании в ручном режиме для получения аликвот сыворотки и плазмы крови от 32 участников потребовалось  $>2$  ч. При этом исполнитель испытывал напряжение и дискомфорт, сложность в безошибочном попадании в маленькие криопробирки

с узким горлом, плотно прилегающие друг к другу в криостативе, что значительно повышало влияние человеческого фактора на точность аликвотирования. Таким образом, в ходе сравнительного эксперимента было показано, что применение автоматизированного метода аликвотирования образцов сыворотки и плазмы крови позволяет сократить временные затраты на 25% и полностью исключить ошибки, связанные с влиянием человеческого фактора.

Валидация метода автоматического аликвотирования образцов сыворотки и плазмы крови в биобанке НМИЦ ТПМ подтвердила соответствие разработанной методики требованиям запланированного крупномасштабного исследования и показала, что применение автоматического раскапывания биообразцов имеет ряд существенных преимуществ перед ручным. Данная методика позволяет повысить качество и эффективность проведения пробоподготовки (преаналитического этапа), в т.ч. сократить на 25% время и увеличить точность аликвотирования биоматериала, а также в 2 раза уменьшить занимаемое биоматериалом место в морозильных камерах долговременного хранения в связи с возможностью использования формата криопробирок с узким горлом.

По результатам проведенных экспериментов было показано, что оптимальный вариант использования ресурсов для запланированного исследования достигается при однократной загрузке робота-аликвотера 24 пробирками с биообразцами от 8 участников, что при запланированных в исследовании 3-х первичных пробирках и 12 аликвотах от одного участника, позволяет обеспечить полную загрузку криостатива на 96 криопробирок по 1 мл за один цикл автоматического аликвотирования.

На финальном этапе была разработана стандартная операционная процедура (СОП) автоматизированного метода аликвотирования с использованием станции Tecan Freedom EVO при проведении преаналитического этапа крупномасштабного исследования. Этот документ содержит подробное последовательное описание всех действий, связанных с автоматическим аликвотированием в рамках данного проекта и позволяет не только контролировать качество выполняемой работы, но и проводить обучение сотрудников-исполнителей.

СОП "Инструкция по автоматическому аликвотированию сыворотки крови, плазмы с ЭДТА и плазмы с цитратом натрия от 8 участников по 12 аликвот" состоит из стандартных разделов: назначение, используемое оборудование и материалы, перечень документов, применяемых при работе и описание процедуры. Назначением данной СОП является установление правил и последовательности работы при аликвотировании биоматериала на автоматическом модульном анализаторе

Tecan Freedom EVO с модулем для анализа фракций крови в биобанке по специально написанным программам для данного проекта. Перечень необходимых материалов и оборудования включает: автоматический модульный анализатор с модулем для анализа фракций крови; персональный компьютер; программное обеспечение EVOware, TubeEye; программу информационного сопровождения биобанкирования FreezerPRO; сканер QR-кодов IntelliCode; криопробирки на 1 мл с нанесенным 2D штрих-кодом 96-луночного формата в штативах и наконечники для автоматического аликвотирования объемом 1000 мкл. СОП подробно описывает правила включения прибора и его подготовки к работе. Далее последовательно описано, как в соответствии с программой, используя опции маски ввода ПО, провести запуск и полный цикл аликвотирования образцов сыворотки, плазмы с ЭДТА и цитратной плазмы. Для каждого типа биоматериала СОП содержит правила расстановки и количество первичных пробирок и криопробирок, проведения процедуры анализа фракций и манипуляций, которые необходимо провести оператору прибора с помощью интерфейса ПО для осуществления полного цикла автоматического аликвотирования. Заключительным разделом СОП является описание процедуры формирования файла в CSV-формате с информацией о полученных аликвотах (идентификационный номер и QR-код участника исследования, вид и объем биоматериала) и этапа загрузки этой информации в программу FreezerPRO, а также правил выключения прибора.

## Заключение

Разработан и валидирован алгоритм автоматического аликвотирования образцов сыворотки и плазмы крови для биобанкирования в рамках широкомасштабного научного исследования.

Подготовка к работе с роботом-аликвотером требует времени, внимательного подбора параметров аликвотирования, расчета оптимального количества пробирок с первичным биоматериалом и криопробирок для получения и дальнейшего хранения аликвот и, главное, написания протокола (программы), включающего все этапы аликвотирования, с использованием ПО робота-аликвотера. Кроме того, важно провести пробные запуски в необходимом количестве для валидации метода. Несмотря на сложность подготовки, дальнейшее применение метода автоматического аликвотирования в широкомасштабном научном исследовании не только облегчает процесс пробоподготовки, но и повышает его эффективность и качество полученных биообразцов.

Автоматическое раскапывание имеет существенные преимущества перед ручным: позволя-

ет осуществить широкомасштабное биобанкирование, повысить качество и эффективность проведения пробоподготовки (преаналитического этапа), в частности, сократить время и увеличить точность аликвотирования биоматериала, исключив влияние человеческого фактора, а также сэкономить место в морозильных камерах длительного хранения благодаря формату используемых криопробирок.

Разработанный алгоритм написания программ аликвотирования и проведения расчетов оптималь-

ного использования расходных материалов является основой для использования в других проектах.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность Александру Лосковичу, руководителю направления "Молекулярная генетика и автоматизация" ООО "Квадрос-Био" за техническую поддержку и консультативную помощь.

**Отношения и деятельность:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Литература/References

1. Coppola L, Smaldone G, Cianflone A, et al. Purification of viable peripheral blood mononuclear cells for biobanking using a robotized liquid handling workstation. *J Transl Med.* 2019;17(1):371. doi:10.1186/s12967-019-2125-7.
2. Schultz A, Germann A, Fuss M, et al. Validation of an automated system for aliquoting of HIV-1 Env-pseudotyped virus stocks. *PLoS ONE.* 2018;13(1):e0190669. doi:10.1371/journal.pone.0190669.
3. Bessemans L, Jully V, de Raikem C, et al. Automated Gravimetric Calibration to Optimize the Accuracy and Precision of TECAN Freedom EVO Liquid Handler. *J Lab Autom.* 2016;21(5):693-705. doi:10.1177/2211068216632349.
4. Mathot L, Wallin M, Sjöblom T. Automated serial extraction of DNA and RNA from biobanked tissue specimens. *BMC Biotechnol.* 2013;13:66. doi:10.1186/1472-6750-13-66.
5. Stangegaard M, Frøslev TG, Frank-Hansen R, et al. Automated extraction of DNA from blood and PCR setup using a Tecan Freedom EVO liquid handler for forensic genetic STR typing of reference samples. *J Lab Autom.* 2011;16(2):134-40. doi:10.1016/j.jala.2010.11.003.
6. Kopylova OV, Ershova AI, Pokrovskaya MS, et al. Population-nosological research biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine: analysis of biosamples, principles of collecting and storing information. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2021;20(8):3119. (In Russ.) Копылова О. В., Ершова А. И., Покровская М. С. и др. Популяционно-нозологический исследовательский биобанк "НМИЦ ТПМ": анализ коллекций биообразцов, принципы сбора и хранения информации. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021;20(8):3119. doi:10.15829/1728-8800-2021-3119.
7. Kozlova VA, Metelskaya VA, Pokrovskaya MS, et al. Stability of serum biochemical markers during standard long-term storage and with a single thawing. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2020;19(6):2736. (In Russ.) Козлова В. А., Метельская В. А., Покровская М. С. и др. Изучение стабильности биохимических маркеров при непрерывном длительном хранении сыворотки крови и при однократном размораживании. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2020;19(6):2736. doi:10.15829/1728-8800-2020-2736.
8. Frégeau CJ, Lett CM, Fourney RM. Validation of a DNA IQ-based extraction method for TECAN robotic liquid handling workstations for processing casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2010;4(5):292-304. doi:10.1016/j.fsigen.2009.11.001.