

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.10.026

分子即时检测平台的现状及发展*

高 芃,曹永彤,马 亮[△]

中日友好医院检验科,北京 100029

摘要:分子即时检测(POCT)平台在医疗领域的重要性日益凸显。这种平台利用便携式分析仪器和配套试剂,在采样现场可以快速得到检测结果,具有准确快速、便携和操作简单等优点。随着聚合酶链反应技术的发展,分子 POCT 平台日益成熟,对常见细菌及病毒感染等领域的精准检测和个体化诊疗起到重要作用。分子 POCT 平台以“样本进结果出”和全密闭操作为核心,避免了气溶胶和样本交叉污染,降低了操作人员的专业要求,使其能够广泛渗透到基层医疗机构和临床科室。该文综述了多种已经开发且相对成熟的分子 POCT 平台,通过阐述各平台的检测原理,检测过程及结果分析等,比较各类平台的特点及优势,为今后分子 POCT 平台的发展奠定基础。

关键词:即时检测; 核酸; 分子检测; 自动化; 平台

中图法分类号:R446.9; R-331

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)10-1434-07

Current status and development of molecular point-of-care testing platforms*

GAO Peng, CAO Yongtong, MA Liang[△]

Department of Clinical Laboratory, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Abstract: Molecular point-of-care testing (POCT) platforms are increasingly important in the medical field. This platform uses portable analytical instruments and supporting reagents, and can quickly obtain test results at the sampling site. It has the advantages of accuracy, speed, portability and simple operation. With the development of polymerase chain reaction technology, molecular POCT platform is increasingly mature, which plays an important role in the accurate detection and individualized diagnosis and treatment of common bacterial and viral infections. Molecular POCT platform is based on "sample in and result out" and fully closed operation, which avoids cross-contamination of aerosol and sample, reduces the professional requirements of operators, so it can widely penetrate into primary medical institutions and clinical departments. This article reviews a variety of molecular POCT platforms that have been developed and relatively mature. By explaining the detection principle, detection process and result analysis of each platform, the characteristics and advantages of each platform are compared, which lays a foundation for the future development of molecular POCT platforms.

Key words: point-of-care testing; nucleic acid; molecular detection; automation; platform

即时检测(POCT),又称为床旁检测,主要是指在采样现场利用可携带式分析仪器及配套试剂快速得到检测结果的一种检测方式^[1]。POCT 具有便携、操作简单快速等优点,可以有效提高医疗效率,并可适用于多种场景^[2]。随着聚合酶链反应(PCR)技术的问世,各类核酸分子检测方法也随之发展,推动了疾病的精准检测和个体化诊疗,尤其在结核分枝杆菌、苛养菌、病毒感染等领域。传统的 PCR 平台对操作

人员技术水平和实验室条件的要求较高,且实验报告周期多在 1 d 以上。因此,分子 POCT 平台凭借其高灵敏度和准确度、检测快速及操作简单等优点,有望成为今后体外诊断行业发展的主流。分子 POCT 需要整合核酸提取、核酸扩增和结果分析等步骤,该平台需做到封闭的核酸自动化检测以避免检测过程中的核酸污染问题,保证快速准确的检测结果及可适用于多种医疗场景^[3]。目前国内外已有基于不同原理

* 基金项目:中央高水平医院临床科研业务费资助(2024-NHLHCRF-PY II-09);中日友好医院“菁英计划”人才培育工程资助(ZRJY2024-BJ02)。

[△] 通信作者, E-mail: liangma321@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20250512.1115.008.html\(2025-05-13\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20250512.1115.008.html(2025-05-13))

技术的多种分子 POCT 平台,主要包括微流控技术、恒温扩增技术、扩增子拯救多重 PCR 技术、试管实验室技术及快速温控技术。因此,本文综述了多种已经开发且相对成熟的分子 POCT 平台,通过阐述各平台的检测原理、检测过程及结果分析等,比较各类平台的特点及优势,为今后分子 POCT 平台的发展奠定基础。

1 基于微流控芯片技术的分子 POCT 平台

1.1 赛沛 GeneXpert Dx 快速检测平台

GeneXpert Dx 快速检测平台是全球首个实现样品制备和检测流程全自动化的实时定量 PCR 仪。该系统运用半巢式定量 PCR 联合微流控芯片技术,可自动化地完成样品制备、核酸提取纯化、定量 PCR 扩增以及结果分析等步骤,还可以根据不同通量的检测需求,组建多机并联检测平台。该平台具有 4 个重要组成部分,包括样本制备系统、试剂稳定系统、荧光定量 PCR 系统和内部质量控制系统。

GeneXpert Dx 快速检测平台的样本制备系统采用微流样品管技术^[4-5],样品管的超声装置可以释放样品中核酸,盒体被分割为多个独立的流动池,通过阀门旋转装置来控制连通和封闭流动池,检测液体可从一个流动池转移到另一个流动池,从而达到洗涤、纯化和浓缩核酸的作用,随后样品进入 PCR 扩增。此外,将不同类型试剂,如酶、特异性引物等分别分装在不同的微珠中可以保证样品和试剂在常温下的稳定保存,从而保证实验的可重复性。GeneXpert Dx 快速检测平台采用模块化设计,每个模块均是独立的运行体系。不同独立模块间组合形成不同通量型号的设备,适用于各种通量需求的实验室。每个模块均独立运作,适合样本“即来即检”,且任何一个模块故障也不会影响其他模块的使用,只需更换损坏的模块即可,为 GeneXpert Dx 快速检测平台提供了效率保证。此外,该系统内还包括设置内参以及对探针检测和样本制备过程的质控,以保证检测的严谨性。

相较于传统的免疫学、荧光定量 PCR 检测而言, GeneXpert Dx 快速检测平台具有以下优势:(1)检测结果准确可靠,全自动操作及内部质量控制系统,保证了检测结果的准确可靠。(2)快速简便,该平台自动完成样品处理、核酸提取及 PCR 扩增的全过程。(3)安全性高,检测过程均在封闭试剂盒中全自动进行,无需复杂的防护措施。在试剂盒的不同通道中完成稀释及提取步骤,降低了交叉污染的可能性。

1.2 BioFire FilmArray 微流控芯片系统

BioFire FilmArray 微流控芯片系统是美国 Biofire 公司研发的基于微流控技术的全自动分子诊断平台(于 2013 年 Biofire 公司被生物梅里埃收购)。该平台基于巢

式多重 PCR 及微流控技术,在微流控芯片中分配出相对独立的多反应腔体,在每一个反应腔体中实现独立反应,从而达到多重反应的效果,实现了在单次反应中的多种病原体核酸检测。整个检测过程包括样本处理、核酸提取纯化、二次 PCR 扩增,并采用 DNA 熔解曲线进行数据分析,可自动获得检测结果^[6]。实验操作包括 4 个步骤:放置测试卡、注入裂解液、加样、启动设备,实验可以在 1 h 内完成,适合用于传染病的早期快速筛查。目前,检测项目主要有呼吸道感染、胃肠道感染、血液感染和细菌性脑膜炎感染。呼吸道病原检测盘、血液培养检测盘和胃肠道病原体检测盘已获得美国 FDA 的审核批准。BioFire FilmArray 是一种全自动化的核酸扩增测试平台,并已有多项研究结果表明该平台具有与金标准方法相当的特异度和灵敏度^[7-9]。在一项 1 612 个前瞻性采集的鼻咽拭子样本的多中心研究中,将基于 BioFire FilmArray 平台的 FilmArray RP2 panel 方法与传统 PCR 和测序方法进行了性能指标的比较。FilmArray RP2 panel 与传统检测方法检测结果的总体符合率为 99.2%。除冠状病毒 OC43、副百日咳杆菌和百日咳杆菌外,RP2 对其他分析物检测的阳性符合率为 91.7%,其对所有分析物的阴性符合率大于 93.8%^[7]。在一项比较 4 种经 FDA 批准的多重呼吸道病毒分子检测试剂盒的研究中,基于 BioFire FilmArray 系统的呼吸道检测盘与在其他在操作时间和易用性方面表现最佳,整个检测过程只需要 1 个步骤,操作时间仅为 0.05 h 且报告结果时间最短。作为一个封闭式系统,其可以避免实验过程中的实验室污染风险,但由于每次只能检测 1 个样本,也限制了其高通量检测的能力^[10]。

1.3 GenePOC revogene 检测平台

GenePOC revogene 检测平台主要针对病原微生物及其耐药基因的快速核酸检测,由加拿大 GenePOC 公司研发^[11]。该系统使用了离心微流控技术,集成了样本处理、核酸提取、PCR 扩增及检测靶核酸序列等步骤,可同时处理 8 个临床样本,每个样本可检测多达 12 个靶标,加样操作时间少于 3 min 并在 1 h 内完成检测。2017 年 6 月, GenePOC GBS LB 检测及其 revogene 仪器获得 FDA 批准。而用于分娩前夕孕妇 GBS 检测 GenePOC GBS DS 及用于艰难梭菌毒素 B 基因检测的 GenePOC CDiff 也已获得 FDA 批准。目前,应用该技术开发的产品覆盖院内感染、呼吸道和胃肠道感染、婴幼儿感染和影响妇女健康的多种病原体检测。在一项针对艰难梭菌检测的多中心评估的研究中,将 GenePOC revogene 检测平台检测艰难梭菌的性能指标与不同的常规检测方法进行了比较,结果表明 Ge-

nePOC revogene 检测平台检测艰难梭菌的灵敏度及特异度分别为 97.1% (95%CI: 93.3%~99.0%) 和 98.9% (95%CI: 98.5%~99.3%)。使用 GenePOC revogene 检测平台是诊断艰难梭菌感染的可靠工具^[12]。另一项基于该平台的 GenePOC Revogene Carba C 试剂盒可用于检测与碳青霉烯非敏感性相关的基因。肠杆菌菌落可以在未进行 DNA 提取的情况下直接进行测试,可在 70 min 内检测出结果。该方法在 2 项研究中评估了 294 株具有分子特征化的临床肠杆菌分离物,其总体灵敏度为 100.0% (95%CI: 98.4%~100.0%),特异度为 100.0% (95%CI: 98.8%~100.0%)。除了常见的 KPC、VIM、NDM 和 OXA-48-like 碳青霉烯酶基因外,还检测到了非常可变的 IMP 变体。与 Xpert Carba-R 相比, GenePOC Carba C 具有相似的检测时间和更简单的样本制备过程,结果更易解读并且单次检测费用略低^[13]。该平台具有以下特点:(1)自动化工作流程,实验操作步骤较少。(2)检测时间短,检测效率高。(3)检测平台灵活,可扩展使用。

1.4 Rheonix CARD®全自动分子诊断系统 Rheonix CARD®检测平台是美国 Rheonix 公司建立的基于微流控技术平台的分子诊断系统^[14]。该系统采用专利的层压工艺将所有的泵、阀门、微管道和反应室整合到 1 个一次性塑料装置中。当加入未经处理的临床样本后,系统可以自动执行所有检测步骤,包括细胞裂解,核酸提取及纯化、多重 PCR 扩增和反向点印记或整合引物延伸实验检测的全过程。目前,该平台可检测基于 3 种不同 CARD®的检测项目,包括可同时检测 4 种性传播感染病原体(淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、苍白衣原体和阴道奈瑟菌)的 STI CARD®、人乳头瘤病毒(HPV)CARD® 和华法林基因分型 CARD®。对于 STI 和 HPV CARD®通过反向点印记法检测扩增子,而在华法林基因分型 CARD 试验中,则通过整合引物延伸实验检测感兴趣的单核苷酸多态性(SNP)。在一项研究中,使用基于 Rheonix CARD®的 HPV 检测和华法林基因分型检测与现有的 FDA 批准的检测方法进行对比,结果表明 Rheonix CARD®的性能不低于甚至优于现有方法。其中,使用 Rheonix HPV CARD 检测了 69 个临床宫颈样本,并与 Hybrid Capture 2(HC2)检测方法进行比较。在 54 个 HC2 阴性样本中,有 48 个在 HPV CARD 上也检测为阴性,剩余 6 个样本在 HPV CARD 上检测到一种或多种 HPV 类型。15 个 HC2 阳性样本中,除 1 个样本在 HPV CARD 上为阴性外,其余均在 HPV CARD 上检测为阳性。此外,使用 Rheonix 华法林基因分型 CARD 检测了 19 个临床样本,其检测结果与

测序结果完全一致^[15]。

Rheonix CARD®全自动分子诊断系统具有以下特点:(1)实验操作简单,快速。该平台使用低密度微矩阵核酸杂交法可以同时检测多个扩增产物。整合引物延伸方法可快速、简便地检测目标基因的多个 SNPs。反向点印记检测采用特异性的寡核苷酸捕捉扩增后的核酸,再与标记有胶体金的特异性的寡核苷酸结合^[15],其优势是芯片成本较低且结果易判读,可半定量或定量检测。(2)检测平台具有多功能性。该平台可支持使用集成的反向点印迹检测或整合引物延伸检测,表明该平台具有可扩展性。(3)检测成本低。该平台使用的塑料装置将所有必要的微流体网络、阀门、泵和储存器结合在一次性 CARD 设备上,可降低实验设备耗材成本。

2 基于恒温扩增技术的 POCT 平台

2.1 ID NOW™ 平台 美国雅培公司的 ID NOW™ 平台(前 Alere™ i 平台,2017 年被雅培公司收购)是一个基于恒温扩增技术和切口酶扩增反应(NEAR)技术的快速检测平台,通过使用特定捕获酶来驱动扩增反应,用于感染性疾病的定性检测。试剂中主要含有切口酶、正向及反向模板核酸和聚合酶等。在聚合酶的作用下,模板核酸与靶基因特异性结合并扩增,随后荧光标记的探针特异性检测扩增产物。NEAR 技术省去了传统的 PCR 扩增过程,因此,该系统是目前检测速度最快的分子 POCT 平台,在几分钟之内便可获得检测结果。目前,该平台是甲型链球菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒和呼吸道合胞病毒的分子快速检测平台^[16]。有研究比较了雅培 ID NOW™ 平台与赛沛 GeneXpert 平台在干性鼻拭子中针对新型冠状病毒检测的能力。在有症状患者的 105 个鼻拭子样本中,Cepheid 平台可以检出所有样本,而在 ID NOW™ 上,仅能检出 91.4% 的样本。该研究表明 ID NOW™ 可快速得出检测结果,适用于病毒载量高的社区传播环境,但在低载量病毒样本中具有较低灵敏度且阴性结果需在其他平台上进行验证^[17]。在一项前瞻性研究中,ID NOW™ COVID-19 方法检测干燥鼻咽拭子时,其灵敏度为 98.0%,特异度为 97.5%,阳性预测值为 96.2%,阴性预测值为 98.7%,与荧光定量 PCR 技术相比检测性能良好。因此,ID NOW™ COVID-19 检测可以作为急诊科实验室荧光定量 PCR 检测的可靠和快速替代方案,有助于实现早期患者管理并减轻医院的负担^[18]。

2.2 EasyNAT®系统 EasyNAT®系统由杭州优思达生物技术有限公司自主研发。该系统由核酸扩增检测分析仪及适配耗材组成,核心技术均已获得国内外发明专利授权。核酸扩增检测分析仪配套优思达

全自动检测管使用,集核酸提取纯化、恒温扩增及检测分析功能于一体,具有功能集中、方便携带、操作简单和防交叉污染等优点^[19]。全自动检测管采用了疏水隔离层(热熔性物质)的设计,可通过外部仪器加热装置,融化隔离层,使得不同腔室相互贯通,实现试剂或样品的混合。不同试剂组分通过疏水层进行隔离,检测管在使用前各分层形成密闭的独立腔室,最上端是裂解区,样本加入后在该区域完成预处理,处理后的核酸与检测管中的磁珠结合,在外部磁导的作用下,核酸穿过疏水层进入清洗区进一步纯化,在洗脱区核酸被洗脱下来,在扩增区完成检测。扩增分析区位于管腿处,其管腿可根据需要设计成单个或多个支管,从而实现单靶标或多靶标联合检测。操作人员只需要一步加样操作,就可以“一键式”完成临床样本中病原体核酸的检测,可用于传染病的辅助诊断,且对检测人员的操作技能和仪器使用环境无特殊要求。

该系统具有 2 个明显的优势技术,包括交叉引物核酸恒温扩增(CPA)技术和试剂玻璃化技术。首先,CPA 技术是一种全新的核酸等温扩增技术^[19],其主要由 2 条外围引物、1 条交叉引物、2 条检测探针和具有链置换功能的 DNA 聚合酶组成。在扩增过程中,起始的核酸扩增产物可自身形成发夹式结构,从而达到 DNA 不断自我复制扩增的目的,在恒定温度下即可快速实现目标核酸的指数级扩增,从而实现核酸解链扩增在同一温度下完成。与目前广泛使用的荧光 PCR 技术相比较,CPA 技术的优点包括:(1)检测速度快。恒温反应时间短,可在 15~30 min 内获得大量产物。(2)仪器成本低。CPA 扩增技术只需要离心机和简单的恒温装置即可进行扩增。试剂玻璃化技术的基本原理是将原本处于液态的生物酶无结晶脱水固化到玻璃态,从而省略了加样、配体系的环节,实验之前仅需加入样本和提取液即可。该技术还实现了试剂的常温运输,摆脱对冷链运输的依赖,降低了试剂的保存和运输成本,保持酶活性并提升反应体系稳定性。实验过程中使用完全密闭的独立检测管,可防止扩增产物片段的污染。目前,有一些研究已经评估了使用该系统检测多种病原体。在一项使用 506 例胃液标本评估儿童肺结核病诊断有效性的研究中,将 EasyNAT 的方法与已建立的 Xpert MTB/RIF(Xpert)和 Xpert MTB/RIF Ultra(Xpert Ultra)方法进行了比较,结果表明 EasyNAT 在检测总体活动性结核病例和细菌学确诊结核病例方面,其灵敏度和特异度与 Xpert 检测法相似。而 Xpert Ultra 方法比 EasyNAT 具有更高的灵敏度,但 2 种检测方法的特异度相似。由于 EasyNAT 方法的成本效益低、检测速度快和准确性等优势,其可能是一种适合用于儿童

结核病诊断的替代方法^[20]。在另一项研究评估了基于 CPA 技术的 EasyNAT 支原体(MP)检测系统的灵敏度和特异度。与传统的荧光定量 PCR(qPCR)相比,EasyNAT MP 检测试剂的检测下限为 500 copy/mL,且与定植于上呼吸道的其他 13 种常见病原体均无交叉反应。在 162 份临床标本中,EasyNAT MP 检测试剂的阳性符合率为 100.00%,阴性符合率为 97.56%。因此,EasyNAT MP 检测系统是一种简单、快速、高灵敏度和特异度的 MP 感染初步诊断方法^[21]。另一项评估 EasyNAT 检测系统用于检测结核分枝杆菌的研究结果表明,与 Xpert MTB/RIF 检测方法相比,基于 EasyNAT 的方法可以检测出更多肺结核患者,特别是在涂片阴性和培养阴性的病例中。尽管 EasyNAT 的特异性略低于 Xpert,但差异并未达到统计学显著性。由于其简单性、快速结果、高灵敏度和低成本等优势,EasyNAT 检测方法可作为肺结核诊断的初筛检测^[22]。

3 基于扩增子拯救多重 PCR 技术 (arm-PCR) 的 POCT 平台

美国 iCubate 公司研发的 arm-PCR 扩增技术的全自动一体化分子核酸检测系统^[23]。该系统由卡盒、卡盒处理仪(iC-处理器)、卡盒阅读仪(iC-Reader)等组成。卡盒是 iCubate 技术平台的核心,包含细胞裂解、核酸提取、目标放大和放大器以及固定捕获探针所需的所有试剂。arm-PCR 扩增技术通常包括 2 轮 PCR 扩增步骤,第 1 轮 PCR 的特异性引物末端连接有保守的核苷酸序列,用以作为第 2 轮 PCR 扩增时引物的结合序列。这样可以保证相对平衡地扩增样本中多个病原体核酸,避免因实际样本中病原体载量不同所导致的不均匀扩增及假阴性结果。在实验操作时,只需把核酸标本从卡盒上方加入至卡盒底部的 PCR 反应孔中,然后将卡盒置于处理仪中即可。该系统主要用于病原微生物鉴定和耐药基因检测,FDA 已批准针对细菌血液感染的革兰阳性球菌及革兰阴性杆菌的检测联卡。基于 iCubate 系统 iC-GPC 方法是一种检测血流感染中常见革兰阳性球菌及其耐药标记物准确可靠的工具。在一项临床评价的研究中,针对 1 134 份革兰阳性球菌阳性血培养标本,分别对基于 iCubate-GPC 方法和革兰阳性球菌阳性血培养方法进行性能指标的对比,结果表明,2 种方法的总体一致性可达到 95.5%^[23]。此外,检测卡盒还包括流感病毒分型卡盒、医院获得性感染病原体卡盒、性传播相关病原体卡盒、消化道感染检测联卡以及呼吸道感染检测联卡等。

在一项评估基于 iCubate 系统的 iC-GPC 方法在直接从阳性血培养液中快速鉴定特定革兰阳性球菌

及其相关耐药基因方面性能的研究中,结果表明 iC-GPC 方法可快速鉴定 5 种革兰阳性细菌和 3 种耐药基因,具有高灵敏度(93.8%~100.0%)和高特异度(98.0%~100.0%)。该方法可以快速、准确鉴定革兰阳性球菌及其耐药基因,同时兼顾操作安全性和检测效率,可以帮助指导适当的抗菌治疗^[24]。iCubate 分子检测平台具有以下特点:(1)多重检测,可以同时检测多种靶标;(2)高灵敏度,可以在 2 μ L 的样品中检测出 10 个 copy 靶标。

4 基于试管实验室技术的 POCT 平台

4.1 Cobas Liat 检测平台 美国 IQuum 公司建立了基于试管实验室技术的 Cobas Liat 检测平台(2014 年被罗氏收购)。该平台是一种快速、易用、紧凑的 PCR 平台,其将气压式微流控技术和实时荧光 PCR 相结合,采用非传统的微流控芯片结构,将核酸提取、PCR 扩增和检测分别集中在检测管的不同区域,通过仪器内部的机械装置,自动化地控制反应液从一个区域转移至另一区域,实现对核酸的快速检测。实验操作简单方便,只需加样、扫描和开始 3 个步骤,30 min 内即可获取结果。检测项目主要有 cobas[®] Liat[®] 甲型流感病毒/乙型流感病毒检测, cobas[®] Liat[®] 甲型流感病毒/乙型流感病毒/呼吸道合胞病毒检测, cobas[®] Liat[®] A 组链球菌检测等。2011 年 FDA 批准了基于该技术的甲型和乙型流感病毒检测方法。在对比赛沛 Xpert Xpress 平台和罗氏 cobas 平台针对新型冠状病毒检测的研究中,结果表明 2 个平台对新型冠状病毒的检测结果存在高度一致性(99.0%)^[25]。该平台可用于 POCT,应用场景广泛。此外,在另一项评估基于 cobas Liat 检测平台的 SARS-CoV-2 & Influenza A/B 检测在鼻拭子样本中临床性能的研究中,与其他分子检测方法(Cobas 和 NIID 的标准检测方法)相比, cobas Liat 方法的总体一致性为 99.3%,阳性一致性为 99.1%,阴性一致性为 99.3%。研究表明 cobas Liat 方法在鼻拭子样本中表现出较高的检测性能,与其他分子检测方法具有良好的一致性。但在少数样本中存在不一致性,需要进一步验证^[26]。

Cobas Liat 检测平台具有以下特点:(1)采用液体流动和混合技术,加快核酸反应速度。实验检测可在 7 min 完成 30 个 PCR 循环,20 min 完成全血样本检测传染病病原体,30 min 完成血浆样本检测^[27-28]。(2)操作简便,检测流程自动化。实验人员只需要加入样本,平台即可自动化完成包括样本处理到结果分析的全部检测流程。在封闭的检测管内进行实验,降低了扩增可能出现的污染风险。(3)完整的质量控制体系。该平台具有内部质量控制和错误提示系统,用于确保检测结果的准确性。

4.2 闪测TM Flash 20 核酸快检平台 闪测TM Flash 20 核酸快检平台由卡尤迪生物科技(北京)有限公司研发,是国内首个获批的可实现 1 min 加样、30 min 检出结果的核酸快检系统^[29]。闪测TM Flash 20 核酸快检系统的温度控制采用陶瓷加热片加热和空气浴冷却方式,4 个检测孔模块独立控制温度,以实现 PCR 扩增所需的温度循环与温度保持,达到使样本扩增的目的。检测平台采用 4 个检测孔模块各自独立的四通道光学检测平台,实时进行荧光强度数据采集,以实现各个检测孔模块实时的荧光强度监测。检测信号通过计算机系统计算出每个被测样本的荧光强度达到预先设定阈值所经历的循环周期数,即 Ct 值,利用已知浓度的系列标准品,建立 Ct 值与起始浓度对数(或起始拷贝数对数)的线性关系,计算出被测样本的起始浓度(或起始拷贝数)。

该系统具有以下特点:(1)模块化设计理念。该系统采用单样本孔独立温控设计,每个模块具有独立的控温及检测部件,可以实现样本随到随检。独立工作的扩增检测模块配合专用软件可以实现 4 个模块完全独立工作,同时或分时运行相同或不同的扩增检测程序。(2)操作简单快速。该系统无需核酸提取,1 min 加样,30 min 检出结果。同时其实现了 4 色光路系统设计,为多重实时荧光定量 PCR 检测提供了良好的硬件保障。(3)检测结果智能分析。其可以显示各种数据和分析曲线,并具有对分析结果储存和调出功能。(4)检测场景多样化。可以满足医院急诊、发热门诊、夜间门诊、基层卫生机构、现场应急检测、海关与机场口岸快速通关等场景的应急检测需求。(5)仪器便携。检测平台体积小巧,降低了对场地的要求。

在一项针对新冠病毒检测的 3 种快速 RT-PCR 检测方法的分析灵敏度比较的研究中,结果表明基于圣湘、卡尤迪和达安基因平台的针对新型冠状病毒检测的最低检测下限分别为 400、100 和 800 copy/mL。与传统方法相比,圣湘和达安基因快速检测平台的检测下限略高(2~4 倍),而卡尤迪平台则显示出与传统方法相同的灵敏度^[30]。

5 基于快速温控技术的 POCT 平台

5.1 iPonatic 快速核酸检测系统 iPonatic 快速核酸检测系统是圣湘生物科技股份有限公司研发的移动便携式核酸检测分析仪^[31]。该分析仪基于圣湘生物的快速核酸释放的专利技术,主要包括受专利保护的病毒裂解液和荧光 PCR 扩增体系 2 部分。经过特殊工艺处理后,膜蛋白可以在无需加热的情况下充分裂解,核酸能够释放到溶液当中。而经过特殊生化工艺处理过的 PCR 缓冲体系能抵抗一定程度的蛋白残

质、病毒内容物、血清中的杂质干扰,不会影响荧光 PCR 过程中荧光信号的采集。该技术旨在满足快速诊断 DNA 类病毒和细菌感染的迫切需求,同时改变了过去由于加热导致检测污染的实际情况。随后搭配快速核酸检测平台,可一步完成样本裂解、核酸提取、PCR 扩增及结果分析等步骤。

该系统具有以下特点:(1)检测快速。从样本进到结果出,DNA 项目的检测时间为 8~30 min,RNA 项目为 15~45 min。(2)操作灵活。该系统具有 4 个独立反应模块,样本随到随检,适用场景广泛。(3)自动智能。可智能语音提示,结果自动分析。

5.2 AGS8830 核酸检测平台 AGS8830 核酸检测平台是广州达安基因股份有限公司采用“实时动态精准温控技术”及半导体制冷片研发而成,最大升温速率可达 8 °C/s,缩短了实验反应的循环时间^[31]。该系统可选择 8 通量和 16 通量,既保证了实验的灵活快速检测,还可提高检测报告效率,从而实现了单样本检测成本最低化。基于该检测平台的新型冠状病毒检测时间只需要 28 min,其原因是使用了“鲲鹏极速扩增体系”。该检测试剂使用特殊处理的酶,缩短了高低温恒温时间。在实验过程中,操作人员无需进行反应体系配制,直接加入样本核酸后即可进行 PCR 反应,可用于各类荧光定量 PCR 检测项目,实现快速核酸检测。运用特殊的反向防污染开盖设计,有效避免因热盖意外弹起导致的核酸污染。

该系统具有以下特点:(1)免核酸提取。使用样本释放剂进行样本处理,5 min 可完成核酸释放过程。(2)快速且通量高。实时动态精准温控,扩增仅 8 °C/s 的高速升温效率,实现高效升降温,缩短检测时间。与传统 PCR 相比,该系统具有 8 通量和 16 通量选择,既增加了操作过程的灵活性,还提高了实验报告效率。(3)仪器便携轻巧。仪器小巧,质量轻,便携高效。高清显示屏操作,无需连接电脑显示器。(4)操作简便。利用固体封盖技术,检测试剂实现了单管单人份包装,不需要 PCR 试剂配制分装,样本释放保存技术,实现了采样与提取集于单管放置,取样采样同步进行,免去了核酸提取时间和提取试剂的配制。(5)使用 UDG 酶防污染。试剂中加入 UDG 酶,以防止扩增产物污染造成的假阳性及内源性内标等。

6 总结与展望

综上所述,分子 POCT 平台以“样本进结果出”和全密闭为核心。在全密闭环境下,样本前处理和 PCR 扩增自动进行,有效规避了气溶胶和样本交叉污染,使得分子 POCT 产品可以脱离 PCR 实验室使用,解决了传统 PCR 实验室对环境苛刻的问题。全自动操作的处理方式降低了对操作人员的专业要求,使得普

通医护人员经过简短培训即可操作。这一优势使得分子 POCT 平台能够渗透到基层医疗机构和临床科室,从而拓展了核酸检测的应用范围。多重分子 POCT 则为快速定位感染病原体提供了新途径,可为后续疾病治疗提供重要支持。对于基层医疗机构和综合医院住院部而言,分子 POCT 平台的选择会因样本通量、检测速度和工作站适用性而异,但都体现了其在不同场景下的优势。分子 POCT 平台不仅在疾病诊断方面发挥重要作用,还对药物研发和公共卫生具有巨大潜力。在药物研发过程中,分子 POCT 平台可以用于药物的筛选和药效评价,提高研发效率,其还可以在疾病爆发时进行大规模的检测,提供即时的数据支持,有助于公共卫生干预和疫情控制。在未来,随着技术智能化和数字化的发展,人工智能和大数据分析等技术的应用将使分子 POCT 平台可以更加准确地预测疾病,并提供个性化治疗方案。随着技术和应用场景的不断拓展,分子 POCT 平台将在医疗领域发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] 中华医学会检验分会,卫生部临床检验中心,中华检验医学杂志编辑委员会,等. POCT 临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(1):10-16.
- [2] GUBALA V, HARRIS L F, RICCO A J, et al. Point of care diagnostics: status and future[J]. Anal Chem, 2012, 84(2):487-515.
- [3] 唐时幸,李文美. 核酸检测 POCT 应用的现状与发展[J]. 中华检验医学杂志,2014(11):824-827.
- [4] VAN RIE A, PAGE-SHIPPI L, SCOTT L, et al. Xpert[®]) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10(7):937-946.
- [5] ULRICH M P, CHRISTENSEN D R, COYNE S R, et al. Evaluation of the cepheid GeneXpert system for detecting bacillus anthracis[J]. J Appl Microbiol, 2006, 100(5):1011-1016.
- [6] PORITZ M A, BLASCHKE A J, BYINGTON C L, et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection[J]. PLoS One, 2011, 6(10):e26047.
- [7] LEBER A L, EVERHART K, DALY J A, et al. Multi-center evaluation of BioFire FilmArray respiratory panel 2 for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab samples[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(6):e01945-17.
- [8] RANADHEERA C, GERMAN G J, STEVEN L, et al. A four specimen-pooling scheme reliably detects SARS-

- CoV-2 and influenza viruses using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2. 1[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):4947.
- [9] KOSAI K, AKAMATSU N, OTA K J, et al. BioFire FilmArray pneumonia panel enhances detection of pathogens and antimicrobial resistance in lower respiratory tract specimens[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2022, 21(1):24.
- [10] POPOWITCH E B, O'NELL S S, MILLER M B. Comparison of the biofire filmarray RP, genmark eSensor RVP, luminex xTAG RVPv1, and luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(5):1528-1533.
- [11] BISSONNETTE L, BERGERON M G. The Gene POC platform, a rational solution for extreme point-of-care testing[J]. *Micromachines (Basel)*, 2016, 7(6):94.
- [12] SAMBRI V, GATEAU C, ZANNOLI S, et al. Diagnosing clostridioides difficile infections with molecular diagnostics; multicenter evaluation of revogene C. difficile assay[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(6):1169-1175.
- [13] LUCENA B L, HAMPRECHT A. A profile of the Gene-POC Carba C assay for the detection and differentiation of gene sequences associated with carbapenem-non-susceptibility[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2020, 20(8):757-769.
- [14] SPIZZ G, YOUNG L, YASMIN R, et al. Rheonix CARD (®) technology; an innovative and fully automated molecular diagnostic device[J]. *Point Care*, 2012, 11(1):42-51.
- [15] LEE H H, DINEVA M A, CHUA Y L, et al. Simple amplification-based assay; a nucleic acid-based point-of-care platform for HIV-1 testing[J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(Suppl 1):S65-S72.
- [16] NIE S P, ROTH R B, STILES J, et al. Evaluation of alere i influenza A & B for rapid detection of influenza viruses A and B[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(9):3339-3344.
- [17] SEREI V D, CRISTELLI R, JOHO K, et al. Comparison of Abbott ID NOW COVID-19 rapid molecular assay to Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 assay in dry nasal swabs[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2021, 99(4):115208.
- [18] NGUYENVAN J C, GERLIER C, PILMIS B, et al. Prospective evaluation of ID NOW COVID-19 assay used as point-of-care test in an emergency department[J]. *J Clin Virol*, 2021, 145:105021.
- [19] XU G L, HU L, ZHONG H Y, et al. Cross priming amplification; mechanism and optimization for isothermal DNA amplification[J]. *Sci Rep*, 2012, 2:246.
- [20] QUAN S T, JIANG T T, JIAO W W, et al. A novel cross-priming amplification-based assay for tuberculosis diagnosis in children using gastric aspirate[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:819654.
- [21] CHEN G, YU J W, CHEN H L, et al. EasyNAT MP assay; a simple, rapid, and low-cost method to detect mycoplasma pneumoniae using cross-priming amplification technology[J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26(3):345-352.
- [22] ZHANG Z M, DU J, LIU T, et al. EasyNAT MTC assay; a simple, rapid, and low-cost cross-priming amplification method for the detection of mycobacterium tuberculosis suitable for point-of-care testing[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1):1530-1535.
- [23] GRANATO P A, UNZ M M, WIDEN R H, et al. Clinical evaluation of the iCubate iC-GPC assay for detection of gram-positive bacteria and resistance markers from positive blood cultures[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9):e00485-18.
- [24] BUCHAN B W, REYMANN G C, GRANATO P A, et al. Preliminary evaluation of the Research-Use-Only (RUO) iCubate iC-GPC assay for identification of select Gram-Positive bacteria and their resistance determinants in blood culture broths[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(12):3931-3934.
- [25] MORAN A G L, BEAVIS K G, MATUSHEK S M, et al. Detection of SARS-CoV-2 by use of the cepheid xpert xpress SARS-CoV-2 and roche cobas SARS-CoV-2 assays[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(8):e00772-20.
- [26] AKASHI Y S U, HORIE M, KIYOTAKI J, et al. Clinical performance of the cobas Liat SARS-CoV-2 & influenza A/B assay in nasal samples[J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26(3):323-331.
- [27] LING L F, KAPLAN S E, LOPEZ J C, et al. Parallel validation of three molecular devices for simultaneous detection and identification of influenza A and B and respiratory syncytial viruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(3):e01691-17.
- [28] GIBSON J, SCHECHTER-PERKINS E M, MITCHELL P, et al. Multi-center evaluation of the cobas® Liat® influenza A/B & RSV assay for rapid point of care diagnosis[J]. *J Clin Virol*, 2017, 95:5-9.
- [29] 马亮, 崔淑娟, 韩呈武, 等. 核酸快速检测系统在新型冠状病毒病毒检测中的应用评价[J]. *中华预防医学杂志*, 2021, 55(2):219-225.
- [30] WANG X L, HUANG Z Q, SONG J, et al. Analytical sensitivity comparison of 14 conventional and three rapid RT-PCR assays for SARS-CoV-2 detection[J]. *J Virol Methods*, 2021, 293:114144.
- [31] YE Q, LU D Z, ZHANG T, et al. Application experience of a rapid nucleic acid detection system for COVID-19[J]. *Microbes Infect*, 2022, 24(4):104945.