

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2026.01.030

酶免反应条件优化对手足口病抗体检测灵敏度的影响分析

朱清滢¹, 谈鸥², 张涛³

(1. 宜兴市疾病预防控制中心 血寄地病防制科, 江苏宜兴 214200; 2. 宜兴市中医医院 检验科, 江苏宜兴 214200; 3. 宜兴市疾病预防控制中心 微生物检验科, 江苏宜兴 214200)

【摘要】目的 探讨酶免反应条件优化对手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 抗体检测灵敏度的影响, 为提高检测准确性和实验室应用价值提供依据。**方法** 选取 2022 年 5 月至 2025 年 5 月收集的 100 例经核酸检测确诊的 HFMD 患者血清标本, 采用单因素梯度设计对反应时间、反应温度、酶浓度及抗体稀释度等关键反应条件进行逐步优化。在不同条件下建立标准曲线, 并评价检测灵敏度、特异度、拟合度及重复性。**结果** 不同反应条件对检测性能的影响均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。较适宜的反应条件为反应时间 45 min、温度 37 °C、酶浓度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体浓度 1:2000; 在此条件下, 灵敏度和特异度分别为 89.50% 和 92.00%, 标准曲线拟合度 R^2 为 0.995, 背景信号降低, 重复性良好 ($RSD < 3\%$)。**结论** 合理优化酶免反应条件可改善 HFMD 抗体检测的分析性能, 提高检测灵敏度、特异度、线性拟合水平及稳定性。

【关键词】 手足口病; 酶联免疫吸附测定; 反应条件优化; 灵敏度

【中图分类号】 R512.5

【文献标志码】 A

文章编号: 1674-1242 (2026) 01-0154-05

Effects of enzyme immunoassay reaction condition optimization on the sensitivity of antibody detection for hand, foot and mouth disease

ZHU Qingying¹, TAN Ou², ZHANG Tao³

(1. Blood-borne Disease Prevention and Control Section, Yixing Center for Disease Control and Prevention, Yixing 214200, Jiangsu, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Yixing Traditional Chinese Medicine Hospital, Yixing 214200, Jiangsu, China; 3. Department of Microbiology Testing, Yixing Center for Disease Control and Prevention, Yixing 214200, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective To examine whether optimization of enzyme immunoassay reaction conditions improves the sensitivity of antibody detection for hand, foot and mouth disease (HFMD). **Methods** Serum samples from 100 patients with HFMD confirmed by nucleic acid testing from May 2022 to May 2025 were selected. Reaction time, incubation temperature, enzyme concentration, and antibody dilution were optimized by a single-factor gradient approach. Standard curves were established under different conditions, and assay sensitivity, specificity, linearity, and repeatability were evaluated. **Results** Assay performance differed significantly across reaction conditions (all $P < 0.05$). The best results were obtained with a reaction time of 45 min, an incubation temperature of 37 °C, an enzyme concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$, and an antibody dilution of 1:2000. Under these conditions, sensitivity reached 89.50% and specificity reached 92.00%. The standard curve showed excellent linearity ($R^2 = 0.995$), background signal was reduced, and repeatability was acceptable ($RSD < 3\%$). **Conclusion** Optimization of key reaction parameters improved the analytical performance of the enzyme immunoassay for HFMD antibody detection, particularly in terms of sensitivity, specificity, linearity, and stability.

【Key words】 Hand, foot and mouth disease; Enzyme-linked immunosorbent assay; Reaction condition optimization; Sensitivity

手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 是儿科常见传染病, 由多种肠道病毒感染引起, 主要病原包括柯萨奇病毒 A16 型 (Coxsackievirus A16, CA16) 和肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71)^[1]。该病传播快, 流行范围较广, 发病人群以 5 岁以下

儿童为主^[2]。多数患儿症状较轻, 但部分病例进展较快, 早期识别和及时诊断仍是临床防控的重要环节。

目前 HFMD 诊断主要结合临床表现与病原学检测。病毒分离和核酸扩增技术虽有较高诊断价值, 但检测流程相对繁琐, 对实验条件和操作要求较高,

收稿日期: 2025-08-12。

作者简介: 朱清滢 主管技师, 研究方向: 感染性疾病。E-mail: coolzqy123@163.com。

且检测周期较长^[3]。相比之下,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)具有操作相对简便、检测速度较快等特点,已成为HFMD抗体检测的常用方法之一^[4]。但在实际应用中,ELISA检测结果容易受到反应条件影响。反应时间、孵育温度、酶浓度及抗体稀释度设置不当时,可能出现信号不足或背景偏高,进而影响检测灵敏度和结果判定^[5]。

关于酶免反应参数优化对HFMD抗体检测性能影响的研究报道较少,针对关键反应条件进行系统比较的资料也相对有限。本研究采用ELISA方法,对反应时间、温度、酶浓度等主要反应条件进行梯度优化,分析其对HFMD抗体检测灵敏度的影响,为检测条件改进及HFMD实验室早期诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为前瞻性队列研究。选取宜兴市中医医院检验科于2022年5月至2025年5月收集的HFMD患儿血清样本作为研究对象。本研究已通过本院医学伦理委员会审批。

纳入标准:①符合世界卫生组织及《中国手足口病中西医结合诊疗指南》相关诊断标准^[6];②经病毒核酸检测或病毒培养证实为肠道病毒71型(EV71)或柯萨奇病毒A16型(CA16)感染;③年龄0~5岁;④临床资料完整,符合HFMD诊断要求。排除标准:①入组前已接受抗HFMD相关治疗;②血清样本在采集、运输或保存过程中不符合质量控制要求。

1.2 HFMD抗体检测方法

1.2.1 试剂准备与反应过程

本研究采用商业化ELISA试剂盒进行HFMD抗体检测。按照试剂盒说明书要求,以EV71或CA16病毒抗原包被微孔板。包被完成后洗板,去除未结合成分。将待测血清按设定比例稀释后加入反应孔中孵育,使样本中相应抗体与包被抗原充分结合。洗板后加入酶标二抗继续孵育,再次洗板后加入底物溶液进行显色反应。

1.2.2 反应终止与吸光度测定

显色达到预定时间后,加入终止液终止反应。

采用酶标仪于450 nm波长处测定各孔吸光度(optical density, OD)值。以OD值反映抗原抗体反应强度,并据此进行后续结果分析及检测性能评价。

1.3 酶免反应条件优化及检测指标

为明确不同反应条件对HFMD抗体检测性能的影响,本研究分别对反应时间、反应温度、酶浓度及抗体工作浓度进行梯度优化。各条件下均记录OD值,并结合灵敏度、特异度及信噪比(signal-to-noise ratio, SNR)评价检测效果。由于本研究未进一步开展多因素联合优化,所得结果主要用于反映趋势并筛选较适宜的反应条件范围。

1.3.1 反应时间优化

设置反应时间为15、30、45和60 min,其余实验条件保持一致。分别测定各时间点OD值,并计算相应灵敏度和特异度。结合各组检测结果,筛选适宜反应时间。

1.3.2 反应温度优化

设置反应温度为20、30、37和45 °C。在其余条件一致的前提下完成检测,记录OD值并计算灵敏度和特异度。根据不同温度下的检测表现,确定适宜反应温度。

1.3.3 酶浓度优化

设置酶工作浓度为0.1、0.2、0.5和1.0 μg/ml。反应结束后测定各组OD值,并比较不同浓度条件下的灵敏度和特异度,以筛选适宜酶浓度。

1.3.4 抗体浓度优化

设置抗体工作浓度为1:1000、1:2000、1:4000和1:8000。检测完成后记录各组OD值,并计算灵敏度和特异度。综合检测信号与非特异性反应情况,确定适宜抗体工作浓度。

1.3.5 标准曲线建立与数据拟合

采用已知浓度标准品绘制标准曲线,并计算决定系数(R^2)。 R^2 越接近1,说明标准曲线线性拟合越好。结合不同条件下的 R^2 、灵敏度及其他检测指标,综合评价各反应条件对检测性能的影响。

1.4 变量控制与质量管理

在优化单一反应条件时,其余实验条件保持一致,以减少混杂因素对结果的影响。反应时间、温

度、酶标二抗浓度及抗体稀释度等条件均按预设条件分别控制。为降低实验顺序及时间因素对检测结果的干扰,各优化条件的检测顺序采用随机安排。不同实验组均按随机顺序完成操作,以减少系统性偏倚。所有血清样本均来源明确,采集、运输及保存条件保持一致。检测尽量在同一实验周期内完成,以减少储存时间及外界条件变化对样本质量的影响。同组实验样本从同批次中随机抽取,以控制批次差异带来的偏倚。各项实验均按统一标准操作程序(standard operating procedures, SOP)进行。包被、加样、孵育、洗板及显色等步骤均由研究人员依照预设方案完成,相关操作条件保持一致,以降低人为误差和系统误差。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行全部数据分析。首先,对所有实验数据进行描述性统计,计算各组的均值、标准差等基本统计量,并检验数据是否符合正态分布。计算并报告灵敏度、特异度及 95% 置信区间(95% confidence interval, 95%CI),评估不同实验条件下的检测性能, $P < 0.05$ 为有统计学差异。多重比较使用单因素方差分析(ANOVA),若差异有统计学意义,则行 Tukey HSD 事后检验,确定最优反应条件。

2 结果

2.1 样本基本情况

本研究共纳入 100 例确诊为 HFMD 的儿童病例,年龄范围 1~5 岁,平均年龄(3.2±1.1)岁。所有病例均符合临床诊断标准,并通过病毒核酸检测或病毒培养确认感染为肠道病毒 71 型(EV71)或柯萨奇病毒 A16(CA16)。所有病例均完成了随访与样本采集,流失率为 5%,有效样本为 95 例。见表 1。

表 1 样本基本情况

基本特征	例数(n)	百分比(%)
总例数	100	100
男性	56	56
女性	44	44
诊断病毒类型		
EV71	60	60
CA16	40	40

2.2 优化反应条件下的灵敏度和特异度

2.2.1 反应时间优化

反应时间的变化对抗原-抗体结合速率及信号强度影响显著。结果显示,反应时间从 15 min 延长至 45 min 时,检测灵敏度和特异度均呈上升趋势,但超过 45 min 后略有下降,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$) 见表 2。

表 2 不同反应时间的灵敏度和特异度变化(%)

组别	反应时间(min)	灵敏度(95%CI)	特异度(95%CI)	SNR
1	15	83.0(76.5~93.2)	90.0(86.3~96.4)	15.3
2	30	85.0(78.1~90.6)	91.2(76.3~95.6)	28.9
3	45	88.0(69.8~98.3)	91.5(80.5~99.3)	45.3
4	60	89.5(70.5~99.5)	91.3(76.5~95.6)	47.5
F	-	6.215	5.702	
P	-	0.004	0.006	

注:95%CI 为 95%置信区间;SNR 为信噪比。

2.2.2 反应温度优化

结果显示,37 °C 为最佳反应温度,而低温(30 °C)及高温(45 °C)均使检测性能下降,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$) 见表 3。

表 3 不同反应温度的灵敏度和特异度变化(%)

组别	反应温度(°C)	灵敏度(95%CI)	特异度(95%CI)	SNR
1	20	80.0(78.3~91.2)	88.0(79.9~98.5)	13.6
2	30	83.5(80.7~99.4)	89.5(76.5~96.3)	29.5
3	37	89.0(77.9~93.2)	92.0(86.5~96.1)	50.1
4	45	87.0(80.6~95.8)	91.0(77.6~98.6)	55.8
F	-	5.117	4.895	
P	-	0.009	0.011	

注:95%CI 为 95%置信区间;SNR 为信噪比。

2.2.3 酶浓度优化

0.5 µg/ml 为最佳反应浓度,此条件下,灵敏度与特异度显著高于其他组(均 $P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同酶浓度的灵敏度和特异度变化(%)

组别	酶浓度(µg/ml)	灵敏度(95%CI)	特异度(95%CI)	SNR
1	0.1	83.0(76.8~90.8)	89.0(78.6~90.8)	18.5
2	0.2	85.0(77.5~88.5)	90.5(80.5~98.3)	22.7
3	0.5	89.0(80.6~98.3)	92.0(70.6~97.5)	36.9
4	1	87.0(79.7~89.6)	91.2(86.3~98.4)	40.1
F	-	4.893	4.562	
P	-	0.011	0.014	

注:95%CI 为 95%置信区间;SNR 为信噪比。

2.2.4 抗体浓度优化

稀释倍数为 1:2000 时检测 SNR 最佳,灵敏度

和特异度最高, 过高 (1:4000) 或过低 (1:1000) 的抗体浓度均会导致检测性能下降, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) 见表 5。

表 5 不同抗体浓度的灵敏度和特异度变化 (%)

组别	抗体浓度 (稀释倍数)	灵敏度 (95%CI)	特异度 (95%CI)	SNR
1	1:1000	85.5 (75.9~92.6)	90.5 (83.2~96.4)	20.6
2	1:2000	88.5 (69.9~96.8)	92.0 (88.3~95.6)	28.9
3	1:4000	86.0 (77.9~90.3)	91.5 (79.9~93.6)	33.1
4	1:8000	84.0 (76.2~90.1)	90.0 (88.5~97.6)	45.7
F	-	5.842	5.334	
P	-	0.007	0.010	

注: 95%CI 为 95%置信区间; SNR 为信噪比。

通过单因素梯度筛选可见, 反应时间 45 min、温度 37 °C、酶浓度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 及抗体浓度 1:2000 时, 检测灵敏度、特异度及信噪比整体表现较优。见表 6。

表 6 优化前与优化后条件下标准品浓度-OD450 对照表

标准品浓度 (AU/ml)	优化前			优化后		
	OD450-1	OD450-2	OD450-3	OD450-1	OD450-2	OD450-3
0 (阴性对照)	0.082	0.079	0.085	0.041	0.039	0.043
1	0.156	0.149	0.161	0.213	0.208	0.219
2	0.278	0.265	0.286	0.396	0.382	0.401
4	0.472	0.455	0.488	0.685	0.664	0.702
8	0.731	0.705	0.754	1.021	0.998	1.045
16	0.981	0.952	1.008	1.324	1.295	1.362

2.3 标准曲线拟合度

最优条件 (反应时间 45 min、温度 37 °C、酶浓度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体浓度 1:2000) 下的标准曲线拟合度达到 0.995, 表明此条件下检测方法表现出最好的准确性和精确性。见表 7、图 1。

表 7 多个变量组合下的标准曲线拟合度

反应时间 (min)	反应温度 (°C)	酶浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	抗体浓度 (稀释倍数)	R^2
15	20	0.1	1:1000	0.961
15	20	0.1	1:2000	0.966
15	30	0.2	1:2000	0.972
15	37	0.5	1:2000	0.977
30	30	0.5	1:1000	0.982
30	37	0.5	1:2000	0.987
30	37	0.5	1:4000	0.989
45	30	0.5	1:1000	0.991
45	37	0.5	1:2000	0.995
45	45	0.5	1:2000	0.992
60	37	0.5	1:2000	0.994

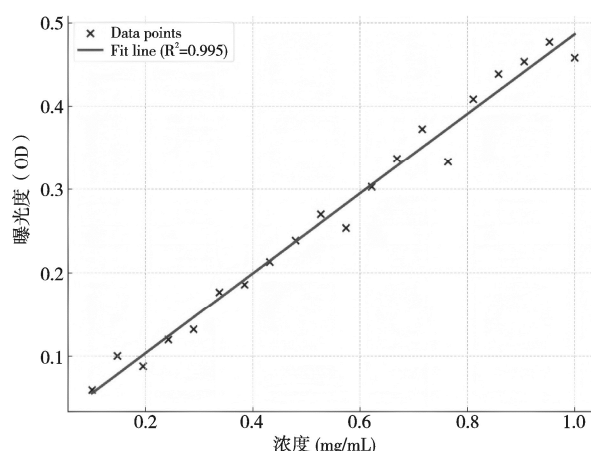


图 1 最优条件下浓度与吸光度散点图

3 讨论

HFMD 是儿童常见传染病, 实验室检测在辅助早期识别和诊断中具有重要价值^[7-8]。ELISA 因操作相对简便、适合批量检测, 已广泛用于相关抗体筛查。但其检测效能易受反应体系条件影响。若孵育时间不足、温度控制不当, 或酶标二抗与抗体工作浓度设置不合理, 均可能导致信号不足或背景升高, 从而影响结果的稳定性和准确性。因此, 对酶免反应条件进行优化具有现实意义。

本研究结果显示, 在反应时间 45 min、温度 37 °C、酶浓度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体浓度 1:2000 条件下, 检测方法的灵敏度和特异度分别达到 89.50% 和 92.00%, 标准曲线 R^2 为 0.995, 提示优化后的体系具有较好的检测性能和线性关系。与未优化条件相比, 反应信号更强, 背景干扰更低, 说明合理调整关键反应条件后, 可在一定程度上改善 HFMD 抗体检测效果。反应时间是影响抗原抗体结合效率的重要因素。时间过短时, 抗原抗体结合及酶促显色反应均可能不充分, 导致检测信号偏弱; 时间过长则可能增加非特异性结合, 造成背景升高。本研究 45 min 优于 15、30 和 60 min, 提示适度延长反应时间有助于提高检测信号, 但超过一定范围后, 检测获益并不继续增加。温度对反应速率和结合稳定性同样具有直接影响。37 °C 条件下检测效果最佳, 说明该温度更有利于抗原抗体充分结合及酶促反应进行, 而过低或过高温均可能影响反应效率和结果稳定性。酶浓度和抗体浓度的设置对 ELISA 检测效果影响明显。酶浓度过低时, 显色不足, 低水平阳

性样本不易识别；酶浓度过高则容易增加非特异性显色，使背景升高，进而影响特异度。抗体浓度同样需要兼顾检测信号与背景干扰，浓度过高或过低均不利于结果判定。本研究结果显示，当酶浓度为0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体浓度为1:2000时，检测信号较为充分，背景干扰相对较低，提示该条件下反应体系更为稳定。由此可见，HFMD抗体检测性能的改善并非由单一因素决定，而是多个关键反应条件共同作用的结果。这些条件通过影响抗原-抗体结合效率及酶促显色过程，进一步改变检测信号、背景水平和体系稳定性。标准曲线拟合度可在一定程度上反映检测体系的线性和稳定性。本研究最优条件下 R^2 为0.995，提示标准品浓度与吸光度之间具有良好的对应关系，检测体系重复性较好，定量结果较为可靠。相反，在反应时间偏短或温度偏低时， R^2 有所下降，说明相关条件下反应不够充分，体系一致性也相对较差。这提示反应条件优化不仅关系到灵敏度和特异度，还会影响检测结果的线性表现和整体稳定性。

本研究仍存在一定局限。样本量相对有限，且样本均来自单中心，研究结果的推广价值仍需更大样本和多中心研究中进一步验证。本研究主要考察了反应时间、温度、酶浓度和抗体浓度，对包被条件、封闭体系及洗板参数等影响因素尚未作进一步分析。后续可在扩大样本来源的基础上，对更多实验环节进行系统优化，以进一步提高HFMD抗体

检测方法的稳定性和适用性。

综上，优化HFMD抗体检测中的酶免反应条件后，检测性能可得到明显改善。在本研究条件下，反应时间45 min、温度37 $^{\circ}\text{C}$ 、酶浓度0.5 $\mu\text{g/ml}$ 及抗体浓度1:2000为较适宜的条件组合，可在一定程度上提高检测灵敏度、特异度及线性拟合水平，对HFMD实验室检测条件优化具有参考意义。

参考文献

- [1] SAGUIL A, KANE SF, LAUTERS R, MERCADO MG. Hand-Foot-and-Mouth Disease: Rapid Evidence Review[J]. Am Fam Physician, 2019, 100(7):408-414.
- [2] CHEN B, YANG Y, XU X, *et al.* Epidemiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in China: A meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(20):e25930.
- [3] 周娜, 吴涛, 陈珊, 等. 济南市某医疗机构手足口病患儿 TLR9 和 TLR7 基因多态性分析[J]. 中国学校卫生, 2024, 45 (12): 1785-1788.
- [4] 廖叶, 朱渝, 张朝勇, 等. 手足口病病毒感染反应特征及诊断方法研究现状[J]. 预防医学情报杂志, 2024, 40 (2): 226-232.
- [5] 程丽红, 郎君怡, 潘欢弘, 等. ELISA 法检测血清 IgM 抗体诊断手足口病急性期患儿 EV-A71 感染效能的 Meta 分析[J]. 江西医药, 2023, 58 (11): 1275-1281.
- [6] 张韵清. 《手足口病中西医结合诊疗指南》的制定研究[D]. 北京中医药大学, 2024.
- [7] ZHAO TS, DU J, SUN DP, *et al.* A review and meta-analysis of the epidemiology and clinical presentation of coxsackievirus A6 causing hand-foot-mouth disease in China and global implications[J]. Rev Med Virol, 2020, 30(2):e2087.
- [8] 廖叶, 朱渝, 张朝勇, 等. 手足口病病毒感染反应特征及诊断方法研究现状[J]. 预防医学情报杂志, 2024, 40 (2): 226-232.