

《疾病监测》审稿意见与作者答复

题目：肠道病毒 EV71 型湖州分离株的遗传进化和重组分析

作者：吴晓芳

审稿专家意见与答复

审稿专家 1 意见：

论文检测及分析合理，叙述较清楚，但建议加入分离株遗传进化和重组分析的公共卫生意义，比如是否对监测有具体指导意义，是否可能获知对 EV71 疫苗效果的影响等等。

审稿专家 2 意见：

论文针对 2011-2012 年分离出的 2 株 EV71 病毒株，进行全基因测序，将所获得基因序列与 EV71 其他基因型序列进行全序列对比，绘制系统进化树，并描述相似性。研究内容充实，研究结果为了解湖州市 EV71 病毒株基因特点提供宝贵资料。但是论文某些地方需要修改、补充与完善。

1、在选择病毒株进行测序时，随机选择是如何实施的？2011,2012 年从多少样本中成功分离鉴定了多少病毒株？

2、在进行病毒序列系统进化树时需要列出比对的病毒株（基因型）名称。

3、本次进行比对的病毒株 E371 和 E696 均为 7406bp 与作者提交的 KJ784495, KJ784496（7415bp）之间差别在哪？

4、论文最后一段“流行病学资料显示”，有无文献支持？若有请补充相应文献。

编辑部汇总意见及作者说明：

论文检测及分析合理，叙述较清楚。某些地方需要修改、补充与完善。

1、在选择病毒株进行测序时，随机选择是如何实施的？2011,2012 年从多少样本中成功分离鉴定了多少病毒株？

分别对 2011、2012 年采集的 174 份和 221 份手足口病疑似病例标本进行了

病毒的分离鉴定,经 Real-time RT-PCR 方法确认收获 EV71 毒株 24 株,包括 2011 年 10 株,2012 年 14 株。按年度选取 2 株 EV71 毒株(2011 年毒株 E371 和 2012 年毒株 E696)进行全基因组序列的扩增和测定。相关内容添加到了材料与方法中的 1.3 中。

2、在进行病毒序列系统进化树时需要列出比对的病毒株(基因型)名称。

在图 1 中,系统进化树中选用的 EV71 各基因型代表株及 A 组肠道病毒其他血清型的原型株均标注了基因登录号、病毒株的名称及基因型别。例如 AB575935 NED/1991 C1 中,AB575935 表示 GENBANK 登录号,NED/1991 表示毒株名称,C1 表示 EV71 C1 亚型。

3、本次进行比对的病毒株 E371 和 E696 均为 7406bp 与作者提交的 KJ784495, KJ784496 (7415bp) 之间差别在哪?

文中描述的病毒株 E371 和 E696 全长为 7406bp,与作者提交的 KJ784495, KJ784496 (7415bp) 相比未包括 polyA 尾,文中的“E371 和 E696 全长均为 7406bp”已改为“E371 和 E696 全长均为 7406bp (未包括 polyA 尾)”。

4、论文最后一段“流行病学资料显示”,有无文献支持? 若有请补充相应文献。

曹洋,洪志恒,金连梅,等. 2011-2012 年全国手足口病疫情监测分析[J]. 疾病监测, 2013, 28 (12): 975-980.
付云,闻栋,刘光涛,朱新风,等. 2010-2013 年浙江省湖州市手足口病流行特征及病原学监测分析[J]. 疾病监测, 2015, 30 (3): 198-202.

5、建议加入分离株遗传进化和重组分析的公共卫生意义,比如是否对监测有具体指导意义,是否可能获知对 EV71 疫苗效果的影响等等。

“CVA16 常常和 EV71 交替或共流行造成手足口病频繁暴发,并且同一时期的手足口病例中可能还存其他不同基因型别的肠道病毒流行,易发生肠道病毒间的基因重组。因此在手足口病病原学监测中对 EV71 的分子特征研究如果只是选取病毒全基因组序列的某一片段序列很可能导致错误的基因分型。基于全基因序列测定和分析的分子监测有利于更准确认识 EV71 的流行型别,及时监测病毒的变异及可能导致疾病暴发流行的重组事件。此外, EV71 基因重组可能导致病毒的抗原性发生改变,甚至导致新基因亚型的出现,这些变化对 EV71 疫苗的研发及保护效果的影响也应予以重视。”以上内容已加入最后一段讨论中。

第一位专家复审意见:

作者修回稿已经参考修改意见进行相应的修改，补充及解释。

可以接受、发表，谢谢。

第二位专家复审意见及作者说明：

本文对 2011 和 2012 年湖州市 EV-A71 各选一株进行了全基因组序列分析，并对基因特征及重组特点进行了研究。文中存在一些错误，建议大修，修改意见如下：

1、病毒的命名, 请参照国际标准命名。肠道病毒 A71 型 (enterovirus A71, EV-A71)；柯萨奇病毒 A 组 16 型 (Coxsackievirus A16, CV-A16)；

已经按照国际标准命名法进行改正。

2、按照目前作者提供的全基因组序列分析的策略，是拿不到 5' UTR 区的准确序列的，如果要拿到准确的全基因组序列，需要进行 5' -RACE 实验；

全基因组的 5' 末端采用 TAKARA 公司的 TAKARA 5`FULL RACE kit 试剂盒进行扩增，在 1.3 EV-A71 全基因组序列测定中进行了补充说明。

3、E371 和 E696 全基因组核苷酸序列同源性的 91.5%，相对偏低，作者在结果“2.1 EV71 湖州株的全基因组序列分析”中，需要进行全长 VP1 区，或全长 P1 区的相似性分析，并在讨论中说明两者差异性较大的原因；

E371 和 E696 的全基因组的核苷酸序列同源性的 91.5%，编码区的核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为 91.%和 98.5%。氨基酸序列同源性相对不低。其中 P1 区、P2 区、P3 区的核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为 92.9%和 99.5%、92.6%和 99.0%、88.8%和 96.8%。两者的核苷酸序列差异主要位于非结构蛋白编码区 P3 区。以上内容已添加到结果和讨论中。

4、在结果“2.2 系统进化分析和重组分析”中，关于 EV-A71 的分子流行病学，目前基于全长 VP1 区核苷酸序列，可以将 EV-A71 分为 A、B、C、D、E、F 和 G 七个基因型（genotype）。其中 A 基因型只有 1 个成员，即 EV-A71 的原型株——BrCr 株；B 和 C 基因型又进一步划分为 B0-B7 和 C1-C6 基因亚型，请作者更新相关内容，并重新绘制图 1。其中，作者没有包括的 B0 基因亚型代表株是 AB491212，B6 基因亚型代表株是 AF135899，B7 基因亚型代表株是 AY278249，C6 基因亚型代表株是 HM622392，D 基因亚型代表株是 JX476184，E 基因亚型代表株是 JN255590，F 基因亚型代表株是 HG421068，G 基因亚型代表株是 KF906416；

讨论第一段关于 EV-A71 的基因分型已经进行了更正，并添加了相关参考文献。由于 B0, B6, B7, C6, D, E, F, G 基因型代表株基本都只有 VP1 的核苷酸序列，因此 P1、P2、P3 区的系统进化树无法重新做，新加入了包含所有基因型别的 VP1 区的系统进化分析。

5、讨论中关于重组的分析，有很多错误的内容。基因重组是肠道病毒（EV）进化的一个重要方式，不同型别 EV 或同一型别 EV 的不同毒株在非结构蛋白编码区以及非编码区都可能发生型别间或型别内的基因重组，极少数情况下，在结构蛋白编码区的 3' 末端也可能发生同源重组。但重组对于 EV，更多的是对 EV 致病力和传播力的影响，而不会影响基因型，因为基因型的确定是由结构蛋白编码区决定的，而结构蛋白编码区往往不会发生重组。请作者多查文献进行修正。

讨论中关于 EV 重组导致出现新的基因型的相关论述已经进行了修正，并添加了相关参考文献。

第三次复审意见及作者说明：

1、作者认为“因此在手足口病病原学监测中，基于全基因序列测定和分析的分子监测更有利于准确认识 EV-A71 的流行型别”，这不准确，准确认识 EV-A71 的流行型别是公共卫生（实验室检测）的基本功，方法学上要越精炼越好，显然“测定全序列才能识别 EV-A71 流行型别”肯定不准确；

2、作者认为“EV-A71 基因重组可能导致病毒的抗原性发生改变”（引用参考文献 17），这篇参考文献全文没有这层含义，事实上，EV-A71 基因重组不可能（或几乎不可能）导致病毒的抗原性发生改变。在非结构蛋白编码区以及非编码区都可能发生型别间或型别内的基因重组，是最常见的重组发生的区域，极少数情况下，在结构蛋白编码区的 3' 末端也可能发生同源重组。而决定病毒抗原性的区域在 VP1-VP3 蛋白上（结构蛋白）。

仍然建议作者多查阅文献，提炼出测定全基因组序列和 EV-A71 重组的公共卫生意义。

谢谢专家的意见。已将讨论中上述不准确的论述删除，最后一段讨论已改为：

流行病学资料显示，CV-A16 常常和 EV-A71 交替或共流行造成手足口病频繁暴发，并且同一时期的手足口病例中可能还存其他不同基因型别的肠道病毒流行，易发生肠道病毒间的基因重组。因此在手足口病病原学监测中，基于全基因组序列测定和分析的分子监测有利于我们更加全面的认识病毒的分子特征，及时监测病毒的变异及可能导致疾病暴发流行的重组事件。

第四次复审意见

作者按照审稿人的审稿意见进行了修改，讨论中最后一段的阐述可以接受，部分说明了测定全基因组核苷酸序列的意义。

建议接收。

第七次专家定稿会意见与答复

定稿会专家意见：

建议发表。

本文按照审稿人的意见和建议进行了详细地修改，建议发表。