**审稿意见与作者修改说明（稿号：2018-0434 ）**

——————————————**初审专家意见与作者修改说明**—————————————

专家1意见：

1、“肉毒梭菌检测方法”相关文献，可以查找到相当数量的利用Real-time PCR 技术检测肉毒梭菌的相关文献。所以希望作者能进一步说明本文中检测方法的创新之处。

回复：同意专家提出的修改意见，文章前言部分已做修改，现进一步阐述本方法的创新点

已有中文文献的报道都是针对肉毒梭菌AB混合型或者A型，没有单独的B型的检测方法。

在国外的文献报道中，有不少关于肉毒梭菌各种血清型的real-time 检测方法研究（文献），但本实验室尝试参照国外文献重复其方法，并没有取得成功，究其原因可能是国内外菌株序列存在差异，因此自主建立了一套方法用于检测国内A、B型肉毒梭菌。

专家2意见：

1. 文章数据推理可靠，有一定的实用性，前言和讨论部分不充分需要补充完善。
2. 毒素基因？是你的实验证明不理想？如果是自己的请详细说明，如果是引用别人的实验结果请添加引文。
3. 本文利用技术检测毒素基因快速鉴定型肉毒梭菌，研究内容可以，但为了突出本文创新和优势，在内容和讨论中，应该大量的引用国内外对该菌的同类研究，横向比较灵敏性及其优缺点，与其它菌株鉴定方法建立的比较意义不大。请补充讨论或正文相关内容。 3、 固然有其优点，但检测模板是，这样就存在非活菌状态的检测的假阳性结果，请注意讨论论述。并且模拟标本不等同于临床标本，其真正的利用价值也值得进一步实践验证，建议增加讨论。
4. 前言和讨论中，此部分内容陈述重复，建议删减。“此外利用荧光定量技术鉴定肉毒梭菌也仅设计了引物和探针，没有关于型的相关研究报道。文中提到：张瑞玲等、王春晖等仅设计了引物和探针，没有关于型的相关研究报道。我认为目前信息知识获得和交流很好，在提到针对
5. 模拟粪便标本中质粒标准品灵敏度检测比纯质粒标准品灵敏度低一个数量级，可能是粪便样本的干扰因素等。
6. 这些传统方法耗时、复杂而特异性不强。建议“而”改为而且.

回复：

1. 国外已有报道肉毒梭菌各种血清型的real-time 检测方法，但本实验室尝试参照国外文献重复其方法，并没有取得成功，因此依据国内肉毒梭菌的特点自己设计检测引物。
2. 已在讨论中增加关于肉毒梭菌各种型别检测的相关情况，删除了其它菌鉴定方法的相关内容。
3. 讨论中增加了临床病例检测结果的数据，以及影响检测结果的其他因素。
4. 已按专家意见删除前言和讨论中重复的内容。7已将“而”改为而且.

专家3意见：

该方法的建立，目的旨在快速鉴定A/B型肉毒梭菌，但方法特异性评价，未见A、B不同型的特异性评价，以及与肉毒梭菌其他型别之间可能的交叉，建议补充相关内容或在讨论中予以特别说明。 该方法如讨论中认为的可用于样品中肉毒梭菌A型及B型菌株的筛检、大规模检疫以及流行病学调查，建议增加方法重复性结果评价。

回复：讨论中已增加不同型别之间的检测情况，增加了临床病例结果验证该方法的准确性。

专家4意见：
1、本文主要技术核心是方法建立，请作者围绕关键词进行精修；

1. 文章前言需要精简，切入主题；
2. 所用的参考菌株无需列表，请文字描述，按照兼性和厌氧进行分类描述，不要过于笼统；
3. 讨论部分，精简理论背景的内容，请作者围绕方法建立的技术路线和可能存在的缺陷进行讨论。任何检测方法，如没有进行大样本的方法比对和确诊阳性病例的验证，结果均存在一定的不确定性概率；
4. 参考文献和全文的格式请参考本刊发表文章进行修改。

回复：

1. 文章已修改
2. 前言已精简
3. 实验所用菌株已按照兼性和厌氧进行分类描述
4. 讨论部分精简了理论背景，增加建立方法的必要性，临床数据验证结果，以及其他影响因素等内容
5. 参考文献按照期刊要求进行了格式修改。

——————————————**复审专家意见与作者修改说明**—————————————

专家1意见：

同意专家提出意见，根据专家意见进行修改。

1. 本文主要技术核心是方法建立，请作者围绕关键词进行精修；
2. 文章前言需要精简，切入主题；

回复：关键词已修改，前言已精炼

专家2意见：

该方法的建立，目的旨在快速鉴定A/B型肉毒梭菌，但方法特异性评价，未见A、B不同型的特异性评价，以及与肉毒梭菌其他型别之间可能的交叉，建议补充相关内容或在讨论中予以特别说明。

回复：肉毒梭菌型别鉴定的相关情况已在讨论中加入，并且深入分析了本研究建立方法的必要性及检测效果。

专家3意见：

所用的参考菌株无需列表，请文字描述，按照兼性和厌氧进行分类描述；

回复：已按照厌氧和兼性厌氧进行分类，已删除参考菌株列表

专家4意见：

1、已基本按要求修改，建议再精炼语言,文中还有一些语言小错误。

回复：已按专家意见进行语言精练

2、建议在对特异性检测的菌株叙述，除第一次外介绍外，其他部分可以简述或分类表述，不用每一种全称表述。

回复：已修改，见文中相应部分红色字体

3、阳性对照和阴性对照菌株的描述不够专业：腊样芽孢杆菌不是厌氧菌？

回复：已按专家意见对蜡样芽胞杆菌进行修改

4、所用阳性和阴性对照菌株的来源（保存机构）和代表性（标准还是参考级菌株？）非常重要，请作者在材料中列清楚；

回复：对特异性评价菌株的信息已列表，详见表1

5、关于实验结果，如对照菌株的测试结果均为阴性，则不必将菌名一一赘述；

回复：已修改，见文中相应部分

6、请作者客观评价论文，在没有进行方法学比较的背景下，尽量减少在摘要和结果中使用带有主观评价的形容词，仅客观描述结果即可

回复：已按照专家意见修改相应部分，见红色字体部分

7、在讨论中增加可能影响检测结果的因素（局限性）；尽量减少在摘要和结果中使用带有主观评价的形容词，仅客观描述结果即可

回复：已按专家意见修改，见讨论中红色字体部分

——————————————**定稿会意见与作者修改说明**——————————————

请您针对专家意见逐条回复，

1、方法类的文章应和金标准对比，样本量比较少，请补充数据或者增加试验结果的可对比结果。研究的方法应具有指导应用价值。

回复：在我国肉毒梭菌感染不属于法定监测传染病，因此感染情况没有官方的数据报告，可供查阅的资料也很少。加之肉毒梭菌感染的发病率相对较低，临床数据非常少。截至2018年12月，本实验室已用此方法检测临床病例14例，准确率100%，样本数量已经不少。小鼠实验是检测的金标准，本文所有数据全部用小鼠实验验证，后续文章会就所检测病例的具体情况以及小鼠实验的结果进行详细介绍。

2、写作格式参考本刊已发表类似文章的图表格式等进行修改，英文摘要和中文一致，最好请专业人员把关。图和表内不用英文，请修改，表内碱基用大写还是小写？

回复：文章格式已按照本刊要求进行修改，图标已修改，表内碱基改为大写。