**审稿意见与作者修改说明（稿号： 2020-0090）**

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

专家意见：

文章使用文献报道的气单胞菌属16S rRNA基因扩增引物，建立SYBR Green荧光PCR检测方法，并评价该方法的特异性和灵敏度。在粪便和咽拭子样本中使用该方法进行初筛，并与分离培养方法进行了比较。该方法对于减少气单胞菌属菌株的分离培养工作量具有一定的帮助。

作为一篇方法学文章存在以下主要问题：

1. 文章用于特异性验证的菌种不足。文章所用的引物来自文献，文献中对于引物的特异性评价是否涵盖了气单胞菌属的常见菌种？前言中介绍“气单胞菌属中11个种可以引起人类疾病”，而文章中用于特异性验证的气单胞菌属的菌种仅有5个。另外其他的肠道常见菌种数目也不足，应特别关注可在气单胞菌增菌液中生长的肠道菌种。应提供NCBI上的序列比对结果以明确引物的特异性。

回复：本研究的引物序列引自文献“Rapid identification of Aeromonas species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates”。本研究基于此序列建立了报道的气单胞菌属16S rRNA基因扩增引物。该文献已经用气单胞菌属常见菌种对此引物的特异性做了全面的评价，所以本研究只是做了简单的特异性验证，未在收集所有气单胞菌属中可以引起人类疾病的11个种开展评测。我们比对了文章中所使用菌种的16S rRNA基因序列，结果显示除了大肠杆菌和志贺菌的16S rRNA基因序列相似外，其余肠道菌间在引物结合区域均存在差异。由于该结果不是本研究的重点，而且非实验结果 ，所有未在文章中展示。该引物在气单胞菌属细菌检测中被使用比较多，所以我们没有再重复文献中对其特异性的评价。

2. 文章中提到“但对于部分弧菌属细菌（部分霍乱弧菌、拟态弧菌菌株），有扩增，其Ct值<17；进一步进行融解曲线分析，扩增目标基因的熔点值在86.67-87.63℃不等，与气单胞菌属的熔点值范围（88.02-88.66℃）有差异。”通过溶解曲线是否能够达到区分非特异扩增的目的？应将非特异扩增的溶解曲线和特异性扩增的溶解曲线放在一张图中进行比较。同时提供足够分辨率的图。该方法确定阳性的Ct值是多少？16还是17？

回复：已添加图2。确定阳性是Ct<16时有扩增。

3.文章仅提供了针对纯菌提取核酸的灵敏度，该方法在样本中的灵敏度是多少，使用水煮法的检测下限如何？

回复：本研究未检测针对样本的灵敏度。

4. 应对分离到菌株但是未检测阳性的标本情况进行分析。这份样本的Ct值是多少？另外扩增阳性未分离到菌株的样本情况如何？是非特异扩增还是Ct值过低？。

回复：无 Ct值。

其他问题见审改稿。

回复：见修改稿。

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

专家意见：文章基本按照要求进行了修改，建议在文章前言中增加所使用引物特异性评价的内容。另外仍需要注意文献的格式。

回复：见修改稿。