**审稿意见与作者修改说明（稿号：2019-0002 ）**

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

专家一意见：

**1.临床样本验证反应体系特异性时，是否尝试过粗制DNA样本作为模板的检测情况；**

回复：本文中没有做粗制DNA检测，但在后续扩大临床样本检测时会考虑加入这部分。

**2.鸭沙门菌作为沙门菌致腹泻的一种病原，作者是否尝试过与其他沙门菌一起进行单管多病原检测？如果可能，请在稿件中加入相应的结果并进行讨论。**

回复：单管多病原检测正在进行中，后续会另有文章发表。

专家二意见：

**1. 前言中“导致56,000人死亡”，确认数据的准确性。**

回复：导致59,000人死亡。

**2. 前言中“鸭沙门菌作为临床常见血清型，时有暴发发生”。应有发表的文献提供支持，目前中国现场流行病学培训项目（CFETP）学员的暴发调查多为肠炎沙门菌，都柏林沙门菌等，在美国CDC2015年FoodNet的报告中鸭沙门菌也没有列入前10位，链接如下，<https://www.cdc.gov/foodnet/reports/data/infections.html>。**

回复：鸭沙门菌虽然不属于我国前10位，但属于前20位。在美国也有报道，鸭沙门菌感染属于前20位（Hassan R . Multistate Outbreak of Salmonella Anatum Infections Linked to Imported Hot Peppers — United States, May–July 2016[J]. Mmwr Morbidity & Mortality Weekly Report, 2017, 66(25):663.）。

国内文献：

[1]常志顺,王传禹,谭红, 等.商品肉鸭沙门氏菌分离鉴定及药敏试验[J].云南畜牧兽医,2014,(4):10-12. DOI:10.3969/j.issn.1005-1341.2014.04.008.

[2]杜昌海,杨万群.一起由鸭沙门氏菌引起的食物中毒调查分析[J].国外医学（医学地理分册）,2012,33(3):189-190. DOI:10.3969/j.issn.1001-8883.2012.03.014.

[3]高迎春.两种病原菌引起的食物中毒实验室诊断结果分析[J].中国保健营养（中旬刊）,2012,(12):301.

[4] 宋冬梅, 李为群, 郝良才. 一起由鸭沙门氏菌引起的食物中毒的检验分析[J]. 中外健康文摘, 2010, 07(33).

[5]戴俊, 文亚林, 张晓英. 一起由鸭沙门氏菌引起的食物中毒调查[J]. 实用预防医学, 2002, 9(3):241-241.

1. **前言中“同时避免普通PCR易造成污染及操作更繁琐的缺点”。 两者均为PCR的方法，要比较的是实时荧光定量比普通的优势在哪里？实验成本？试剂的可及性？使用的频率？使用的状况？是否为常规使用？此处的定位是基层还是市级省级疾控的复核？是快速筛查鉴定还是进一步了解我国沙门菌食源性疾病事件的具体病原分布？**

**另外鸭沙门菌引起疾病发生的情况应有数据支持，沙门菌的疾病负担严重是一个方面，另一个方面是鸭沙门菌引起疾病负担的情况，为什么要在众多的沙门菌中对该菌进行研究，其研究结果具体可以达成什么预期？如果是对暴发流行有助益，那么更要交代目前由该血清型引起暴发的现况，是否该方法在具备可及性可接受性并且符合成本效益等的前提下，优于目前已有的方法？应在对该研究立题的合理性充分论证的前提下，再介绍研究结果下一步的应用建议和收益。**

回复：本文中建立的检测方法既主要针对基层进行沙门菌感染的快速筛查鉴定，又可助益暴发流行。鸭沙门菌虽然不属于我国前10位，但属于前20位，在美国，鸭沙门菌感染也属于前20位。如专家所言，由鸭沙门菌引起的暴发远少于肠炎沙门菌、都柏林沙门菌和鼠伤寒沙门菌等，研究鸭沙门菌的主要问题是近年来我们在监测中发现其H2相抗原与H1,7交叉凝集现象明显，多次导致血清型误判，引起暴发疫情的误报，这都对后续流行病学调查及该菌的疾病负担造成误导。传统血清凝集方法中血清价格高、血清质量参差不齐、鉴定过程耗时长、结果主观性较强，而采用PCR方法可以克服以上不足，但由于该血清型存在血清凝集的误判，造成暴发病原的误报，这都对后续流行病学调查及该菌的疾病负担造成误导。

本文也正是基于这方面的原因，研发了分子诊断。在基层疾控及医院都已普遍配备荧光PCR仪，荧光PCR能够作为病原常规检测方法。与普通PCR比较，荧光PCR更适用于基层，这避免了PCR产物的手工电泳，勿需购置电泳所需仪器及试剂，有效避免开盖操作造成的污染等。荧光PCR试剂及普通PCR试剂均容易获得，虽然荧光PCR试剂贵于普通PCR试剂，但前者操作更简单、所需时间更短、而且重要的是可以避免二次开盖污染，因此，荧光PCR相交普通PCR更易在基层推广，也比目前病原分离更易于被基层接受。鸭沙门菌只是沙门菌的一种血清型，要了解我国沙门菌食源性疾病事件的具体病原分布，还需与其他方法结合使用才行，其他病原目前尚无好的PCR筛查方法。

**4. 材料与方法中“238株肠道常见病原菌菌株作为检测灵敏度及特异度的菌株”，这都是随机选出来的吗？为什么要随机选择？既然是为了避免误判，那么研究结果的获益就是使鉴定更有特异性，为什么不有针对性的选择容易引起误判的血清型以具体进行比较呢？**

回复：这238株菌株是根据实验目的选择的，包含了155株沙门菌和83株其他肠道病原菌。选择这些菌株是为了尽可能多的包含常见的肠道菌株及其他已报道的沙门菌血清型，用于验证引物的特异度。本研究一方面的目的是避免鸭沙门菌血清型的误判，另一方面也希望在临床应用中能从最原始标本中快速检测出鸭沙门菌，排除其他肠道病原菌的干扰。为同时达到上述两个目的，故随机选择了尽可能多的多样化的代表菌株（每种菌株的数量都较多，若全部纳入研究的话，菌株数量太庞大，于研究也无裨益）。

**5. 实验结果中“健康人粪便样本中也未见扩增”，是否未见扩增就是特异性好？沙门菌等病原是否存在无症状感染？其感染谱是否从无症状感染至并发症死亡均具备？多少份标本？其样本量选择的依据？另外是否最低检测下限可以从临床标本检测获得？**

回复：未见扩增说明引物特异性好。本文中作为对照组的临床样本均已做病原菌分离鉴定，确定没有鸭沙门菌，故未见扩增，说明在临床应用中，该PCR反应能特异性的鉴定鸭沙门菌。

沙门菌病原存在无症状感染或无症状携带，但携带率较低（千分之三左右），并发症少见，鸭沙门菌无症状少见，且健康人带菌率较低（万分之三左右）。沙门菌感染主要是腹泻、发热，存在一定程度的自愈。

本文健康人粪便样本为40份，为健康从业人员粪便，分别来自云南、山东、广西三省，鸭沙门培养及PCR检测均阴性。样本量按统计学最低量10份以上选择。

最低检测下限可以从临床标本检测获得，但存在数据不准确的问题。因为我们无法确保标本中细菌的状态，且标本之间、标本批次之间会存在差异，所以以模拟标本进行下限的估算更好一些。

专家三意见：

**1. 本文创新点中“更适于处理疾病暴发导致的公共卫生事件”，描述与实际工作不符。**

回复：在处理鸭沙门菌导致的公共卫生问题的过程中发挥重要价值。

**2. 引言中“非伤寒沙门菌（nontyphoidal Salmonella spp., NTS）作为重要的食源性致病菌，已成为全球普遍关注的公共卫生问题之一”，该句有语病，请修改。**

**非伤寒沙门菌引起的疾病才是公共卫生问题。**

回复：非伤寒沙门菌（nontyphoidal Salmonella spp., NTS）作为重要的食源性致病菌，其导致的疾病已成为全球普遍关注的公共卫生问题之一。

**3. 鸭沙门菌血清抗原式？**

回复：3,{10}{15}{15,34}:e,h:1,6

**4. 引言中“时有暴发发生”，是否有参考文献可以引用？**

回复：

参考文献：

[1] Hassan R . Multistate Outbreak of Salmonella Anatum Infections Linked to Imported Hot Peppers — United States, May–July 2016[J]. Mmwr Morbidity & Mortality Weekly Report, 2017, 66(25):663.

[2]常志顺,王传禹,谭红, 等.商品肉鸭沙门氏菌分离鉴定及药敏试验[J].云南畜牧兽医,2014,(4):10-12. DOI:10.3969/j.issn.1005-1341.2014.04.008.

[3]杜昌海,杨万群.一起由鸭沙门氏菌引起的食物中毒调查分析[J].国外医学（医学地理分册）,2012,33(3):189-190. DOI:10.3969/j.issn.1001-8883.2012.03.014.

[4]高迎春.两种病原菌引起的食物中毒实验室诊断结果分析[J].中国保健营养（中旬刊）,2012,(12):301.

[5] 宋冬梅, 李为群, 郝良才. 一起由鸭沙门氏菌引起的食物中毒的检验分析[J]. 中外健康文摘, 2010, 07(33).

[6]戴俊, 文亚林, 张晓英. 一起由鸭沙门氏菌引起的食物中毒调查[J]. 实用预防医学, 2002, 9(3):241-241.

**5. 引言中“H2相抗原与H1,7交叉凝集”，鸭沙门的H相为e,h:1,6，与H2，H1,7的交叉凝集无关，不能导致鸭沙门血清型误判。**

回复：理论上来说，鸭沙门菌H抗原是不会与H1,7发生交叉凝集的，但在实际操作时，由于血清质量问题，或是菌株抗原表达等原因会出现交叉凝集的现象。2017年山东省疾控中心和云南省疾控中心送至我们实验室复检的沙门菌菌株的血清凝集结果均出现了这种情况。而且凝集用抗血清都来自SSI。

**6. 1.1 实验用菌株中“沙门菌抗血清购自丹麦国家食品研究所”，请确认是丹麦国家血清研究所（Statens Serum Institut, SSI）还是丹麦国家食品研究所。**

回复：沙门菌抗血清购自丹麦国家血清研究所。

**7. 1.3实时荧光定量聚合酶链式反应中“结果判定：对于*C*t值≤35的扩增结果判定为阳性；*C*t值在33~35之间，需重复试验”，该结果判定的方法前后矛盾。**

回复：结果判定：对于*C*t值≤33的扩增结果判定为阳性；*C*t值在33~35之间，需复检两次：若其中至少一次*C*t值≤35，判为阳性结果；

**8. 1.6 临床标本检测中“140份样本经细菌分离培养后，其中鸭沙门菌培养阳性50份，鼠伤寒沙门菌10份，肠炎沙门菌10份，产酸克雷伯菌3份，副溶血弧菌5份，非O1非O139霍乱弧菌3份，EAEC 15份，EPEC 10份，ETEC 3份，弯曲杆菌3份，小肠结肠炎耶尔森菌3份，嗜水气单胞菌感染20份，剩余5份样本细菌（涵盖五类致泻性大肠杆菌、沙门菌、弯曲菌、金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、气单胞菌、小肠结肠炎耶尔森菌）培养阴性”，该部分内容应该属于结果，而不是材料和方法。**

回复：将此部分移至“2.4临床标本检测结果”。

**9. 讨论中“为进一步检测目的基因片段与产酸克雷伯菌之间可能存在的交叉反应现象”，请引用参考文献说明与产酸克雷伯菌的交叉反应。**

回复：见文献：韩营营，段瑶，李杰，等. 利用PCR 快速检测粪便标本中的鸭沙门菌[J]. 疾病监测, 2018,33(3):246-250.

在本研究过程中，通过扩增片段序列Blastn分析，发现目的片段与产酸克雷伯菌一段编码假想蛋白的基因序列一致性高，故实验过程中加入产酸克雷伯菌感染的临床样本进行验证。

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

专家意见：

**专家1：已经按照意见进行修改，建议录用。**

**专家2：请确认研究菌株选择时的抽样方法，随机抽样如何操作？是随机数还是其他方式？抑或便利抽样？描述清楚。**

回复：菌株选择时采用便利抽样方法。因为本实验室中不同血清型沙门菌菌株数量差别很大，常见血清型菌株数量大，不常见血清型一般只有几株甚至一株，故在选取样本时，菌株数量多的血清型尽量选择5株以上，不常见血清型菌株全部包含在抽样样本中，最终获得除鸭沙门菌外的155株沙门菌样本。

**专家3：已做相应的修改，录用。**

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

本文经这次修改后，基本达到要求，可以发表，谢谢！