

図3)

SFTSV NPの発現 抗血清の作製

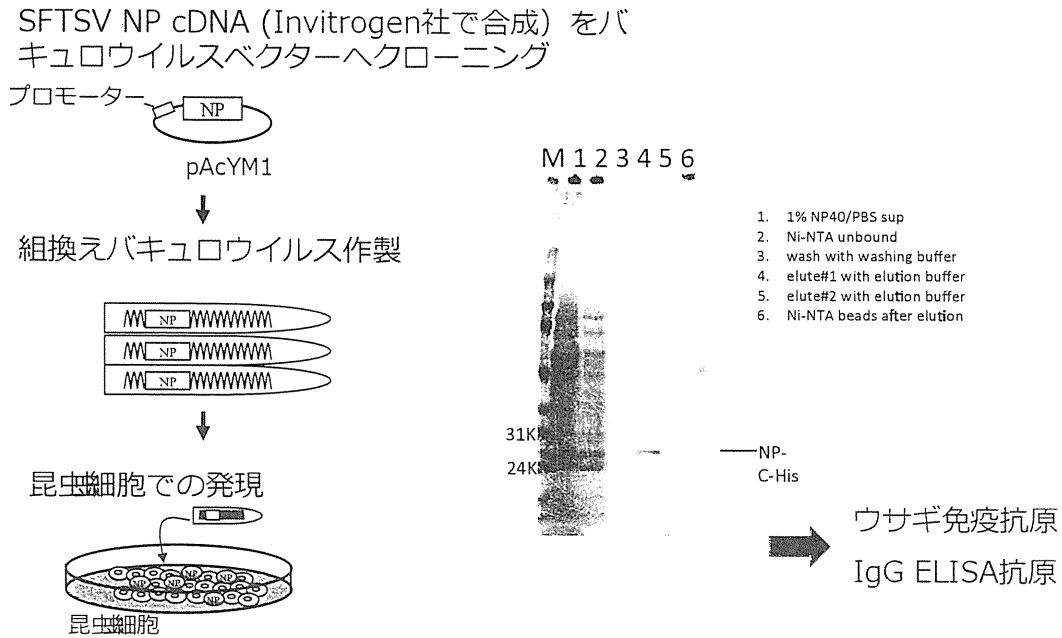
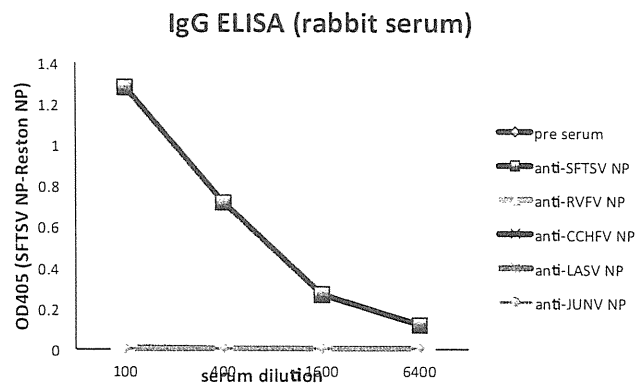


図4)

SFTSV NP ELISA

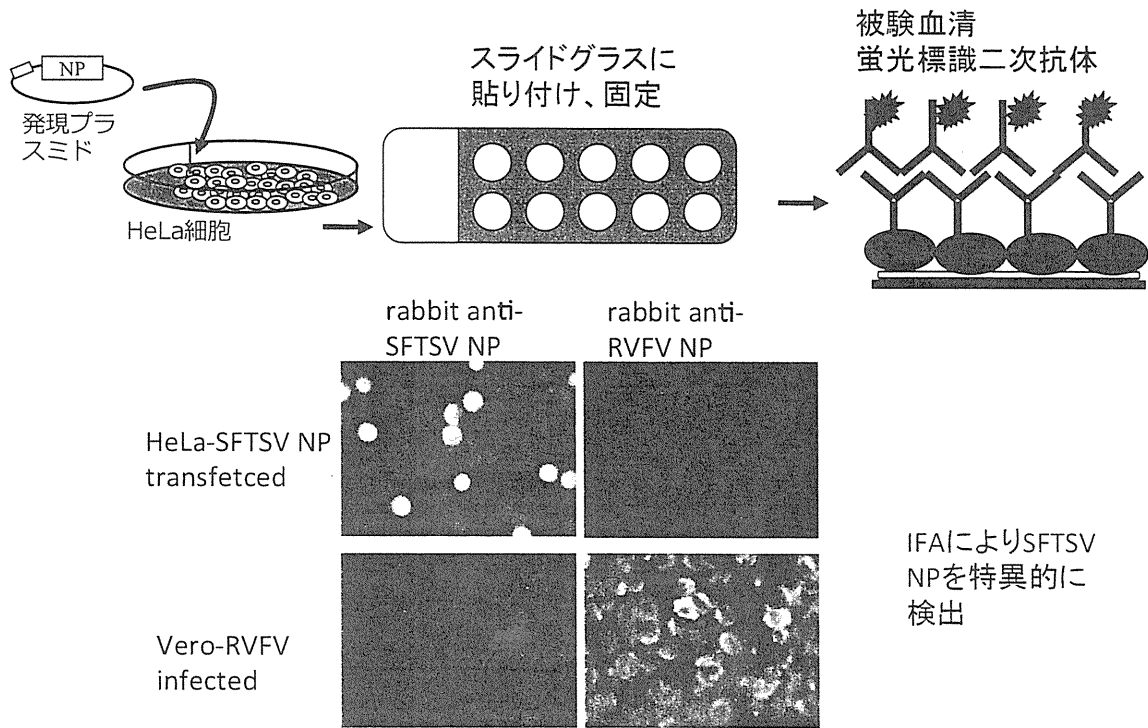
抗原: リコンビナントSFTSV NP



ELISAによりSFTSV
NPを特異的に検出

図5)

間接蛍光抗体法 (IFA)



「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

急性呼吸器感染症 (ARI) は小児死亡原因の第一位であり、世界では毎日 5,000 人の子供が死亡しているといわれている。多くの ARI ウイルスは咳を介して感染することから感染力が強く、瞬間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、我々研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると考え。我々は中国 CDC のインフルエンザ研究センターと連絡をとり、ARI の共同研究体勢の構築を試みる。

ARI ウイルスにはインフルエンザ、RS、パラインフルエンザ、メタニューモ、コロナ、アデノ、ライノ、ボカウイルスが知られており、95%はこれらを原因とするが、残り5%の原因は未だに不明である。今回我々は中国 CDC の Yuelong Shu 博士と共同研究を開始し、情報を共有し、インフルエンザ以外の ARI ウイルスについて、原因不明病原体の解析、ウイルス分離技術の向上を試みる。また、ARI の予防治療に関しては、感染を未然にあるいは軽度で終わらせることが理想であるが、実際インフルエンザ以外のほとんどのウイルスについては、特別な治療薬もワクチンも無く、重症化しても対症療法に頼るのが現状である。我々は、ウイルス感染機構の解明と、治療薬の開発を試みる。

A. 研究目的

ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々あるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。培養細胞で増殖が可能なウイルスは研究が良く進み、不可能なウイルスは研究が遅れる傾向がある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は極めて難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くなってしまふことが知られている。最新の培養法を用いれば、肺胞の性質とインフルエンザウイルスの感受性を維持したまま長時間培養できることが報告されているが、極めて特殊な技術であることに加え高価であり、簡単に扱えるものではない。また、よく研究に利用されている肺胞由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、増殖が遅く性状

が不安定であり、培養も難しい。肺胞の性質を維持しつつ扱いやすい培養細胞があれば、新たな ARI ウイルスの分離や既存の ARI ウイルスの基礎研究が劇的に進展することが期待できるだけでなく、病原体診断やサーベイランスの分野でも利用できるはずである。我々は Calu-3 細胞を用い、ARI ウイルスの感受性がより高くなるように改良を行う。

また、巷のウイルスは常に変化しており、ウイルス遺伝子の変異のトレンドを解析することは、現在流行しているウイルスの性状を知ることと、治療法の開発へと繋がる知見となる。最近の我々の研究では、コロナウイルス 229E で、比較的重い症状を示すウイルス株は、肺胞特異的プロテアーゼ (TMPRSS2) に対する感受性が高くなる傾向があった。さらに TMPRSS2 の活性を抑え

る阻害剤を用いれば、培養細胞レベルではあるが、229E の感染を抑える事ができることを見出している。この知見を他の ARI ウイルスにも広げて、ウイルス遺伝子の変異とプロテアーゼ感受性の関係を明らかにし、抗ウイルス薬の開発へと繋げていきたい。

今回の共同研究において、中国 CDC が持つ病原体サンプルの遺伝子配列を利用して、プロテアーゼ感受性のトレンドを調べ、感受性細胞の開発、抗ウイルス薬の開発の研究に応用することを提案したい。

B. 研究方法

研究の方法はまだ未定であるが、本年3月6日に Yuelong Shu 博士を訪問し、具体的な共同研究項目を話し合いたい。我々としては、①ARI ウイルス感受性細胞の開発、②ウイルスの遺伝子変異によるプロテアーゼ感受性の変化の研究、③抗ウイルス薬のスクリーニングを提案したい。

C. 研究結果

我々は、研究実施の準備として、ARI ウイルス

株、感受性細胞株の整備を行った。現在、インフルエンザ、コロナ、メタニューモ、パラインフルエンザウイルスの研究体制を整えている。共同研究ははじまっておらず、研究結果は無い。

D. 考察

無し

E. 結論

まずは、カウンターパート(中国 CDC)へ訪問してお互いの活動内容や研究環境を発表し、理解しあい、今後できうる共同研究テーマについて協議する。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

薬剤耐性淋菌の分子タイピング

研究分担者	中山 周一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	志牟田 健	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：最後の有効薬剤、セフトリアキソンに耐性の淋菌の出現と拡散動向を把握することを中心に分離株サーベイランスとその分子タイピングを行った。既に出現した *penA* 遺伝子変異による耐性株の顕著な拡散は認められなかった。また、 β -lactamase の基質拡張型変異の一步手前となるタイプの淋菌の存在を確認するとともに、その prevalence を β -lactamase 保有淋菌の多いタイで検討した。前者の拡散を今後とも封じこめるとともに、後者の動向を今後注意深くモニターする必要がある。

A. 研究目的

薬剤耐性の獲得とその拡散が非常に早い淋菌では、継続的な分離株サーベイランスにより、よりタイムリーな治療ガイドライン改定を行う必要がある。従来、国、地域毎に行われてきたこの作業を近隣国と行うことで、より有効なアクションを取れることが期待される。そこで中国との共同での分離株サーベイランスと分子タイピングのプロジェクト開始を目指している。このため、モデルケースとして、近年特に危惧されている、最後の有効薬剤と目されるセフトリアキソンに耐性な淋菌の出現と拡散のモニタリングを兼ねる形で、世界初のセフトリアキソン耐性菌 (*penA* 変異型) 出現を見た日本の関西地域でのその後の分離株解析と、今後危惧される β -lactamase の

基質拡張型変異によるセフトリアキソン耐性菌出現の可能性評価のため、タイの β -lactamase 保有淋菌を解析する。結果を中国の研究者にアナウンスし、今後の共同サーベイランス提案を行う。近隣国と共同での最新の分離株サーベイランス結果の結果の国間比較により、耐性プロファイル、菌系統の類似点、相違点を継続的に把握することで、国間のクローナル拡散の傾向について基礎的データが得られる。このことは、将来、新規な耐性がどちらかの国で発生した場合の他方への到来の時期を予測する根拠となるため、両国での治療ガイドラインのよりタイムリーな改定法の確立に向け有用である。このための基礎データ収集を中国との間で確立するための交渉でモデルデータとして使う実例を作

製する。

B. 方法

1) 分離株：

日本国内株は、世界初のセフトリアキソン耐性の出現^{1,2)}を見た関西地域の協力クリニックから送付された株を使用した。分離年月は2010年4月から2011年7月のものである。タイのβ-lactamase 保有淋菌はマヒドール大学でのプロジェクトで体系的に収集された96株で、分離年は2005年から2008年である。

2) MIC 測定：

E test シート (AB bioMerieux, Solna, Sweden) を用いて、仕様書に従って測定した。

3) MLST 及び、NG-MAST タイピング：

それぞれ、確立している Jolley の方法³⁾、Martin らの方法⁴⁾に従った。

4) MLST 型による Minimum Spanning Tree の

作製：

MLST 型のデータを基に、MST 計算、作製ソフト、BioNumerics version5.1 (Applied Math) を使用して系統樹とクラスターを描画した。

Single locus variant 及び double loci variant で直接、間接に連結できる MLST 型の集団を1クラスターと判定した。

C. 研究結果

1) 日本（関西）地域の協力クリニック分離株のサーベイランス：

以下のことが判明した。

① 世界初のセフトリアキソン耐性淋菌が

2009年に京都で分離されたが、この地域での強化サーベイランスの結果、第2の耐性菌は現時点で検出されず、少なくとも顕著な耐性拡散は進行していない。

② MLST タイピングにより、菌系統を観察したところ、この期間もこの5年間の傾向の通り、日本分離株では ST1901 と ST7363 が主流を占め、大きな相変異は見られなかった。

③ NG-MAST タイピングにより、菌表面抗原型を観察したところ、いわゆる「世界流行型」の ST1407 の分離頻度が高くなっていること、この抗原型の菌は、依然セフトリアキソン感受性ではあるものの、その MIC には明らかな上昇傾向が見られ、今後その動向を注視していく必要があることがわかった。

2) タイに於けるβ-lactamase 保有淋菌（以下、PPNG と呼ぶ）の解析：

PPNG の保有するβ-lactamase は近年まで、プロトタイプの TEM-1 以外は発見されていなかったが、2009年タイと日本で、初めて TEM-135 型を保有するものが検出された^{5,6)}。TEM-135 は基質拡張型β-lactamase ではないが、1塩基置換変異のみで基質拡張型の TEM-20 となり得るタイプである⁷⁾。対して、TEM-1 は知られているいかなる基質拡張型になるにも最低2塩基の変異を必要とする。そこで、TEM タイプの決定をも含めて、2005年～2008年に分離されたタイの96株のPPNGの分子タイピングを行った。結果、以下のことが分かった。

- ① 96 株中、TEM-135 は 9 株 (9.4%)、他の 87 株はすべて (90.6%) TEM-1 であった。この 2 つのタイプ以外は発見されなかった。1 塩基置換のみで基質拡張型となり得るのがマイナー、~10%の比率ながら、タイプでサーキュレーションしていることが初めて示された。
- ② MLST タイピングで菌系統を調べ、Minimum Spanning Tree を作製してクラスタリングを行った。そのクラスタリングが TEM 型と何らかの相関があるかを検討した。その結果、TEM-1 型は大小 2 つのクラスターに分かれた。TEM-135 型の 9 株中、8 株 (88.9%) は TEM-1 型の 2 つのクラスターとは別の単一クラスターを形成して集積したが、1 株 (11.1%) は TEM-1 型クラスターの方に属した。このことから、今回検出された TEM-135 型 PPNG は、大部分の、既に TEM-1 型とは系統が分離した集団と少数の、TEM-1 型から最近の変異導入で新生したもの (TEM-135 は TEM-1 から 1 塩基置換で生成し得る) とが共存しているらしいことが推測できた。

D. 考察

国内でのサーベイランス結果から、セフトリアキソン耐性淋菌の初例以降、同一地域にもこの拡散は見られない。2010 年に報告のあったフランスでの 2 例目のセフトリアキソン耐性淋菌出⁸⁾後のサーベイランスでも拡散は認められておらず⁸⁾、変異型 *penA* による耐性は growth fitness defect を伴う可能性がある。このタイプに関しては、拡散動向をモニタリングすることが今後重要である。

今後の出現に備えるターゲットは、基質拡張型 β -lactamase を保有する PPNG である。前述のように、これに関しては基質拡張型の前駆体、中間体とも言うべき TEM-135 の存在が確認され、そのタイプに於ける prevalence も約 10%、という具体的な数字を算出できた。今後このタイプについては、TEM-135 の prevalence の上昇に加え、それからの基質拡張型、TEM-20 の新生を注意深くモニターしていく必要があると思われる。

E. 結論

日本及びフランスで確認された変異型 *penA* 遺伝子によるセフトリアキソン耐性は現在、顕著な拡散状況にないが、今後その動向を引き続き観察する必要がある。日本国内で、セフトリアキソン MIC が上昇傾向にある NG-MAST ST1407 型菌が増加している。今後この動向を注視すべきである。基質拡張型 β -lactamase によるセフトリアキソン耐性菌出現が危惧されている。基質拡張型の前駆体タイプの PPNG がタイプでマイナー集団ながら存在確認された。このタイプの prevalence 上昇と基質拡張型生成をモニターしていく必要がある。このプロジェクトは元来、中国との共同研究であるが、中国側の正式合意が未決であるため、現在共同研究の形では進行できていない。今後、今回のデータを提供し、PPNG の多い中国でのそれらの株の解析の重要性を説明し、プロジェクトを本格始動させる必要がある。

謝辞

今回解析した国内菌株を分与くださった、

各クリニックの飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、亀岡博、古林敬一（敬称 略）の諸先生に感謝いたします。また、菌株 DNA を供与、解析の一部も行っていただきました、タイ、マヒドール大学の Srifuengfung 教授ならびに同大学、付属病院のスタッフ諸先生に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Ohnishi, M., et al. 2011. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 17:148-149.
- 2) Ohnishi, M., Golpalian, D., Shimuta, K., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., Nakayama, S., Kitawaki, J., and Unemo, M. 2011. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable Gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to Ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 55:3538-3545.
- 3) Jolly, K. A. 2001. Multi-locus sequence typing. *Methos Mol. Med.* 67:173-186.
- 4) Martin, I. M. C., Ison, C. A., Aanensen, D. M., Fenton, K.A., and Spratt, B. G. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* 189:1497-15015.
- 5) Srifuengfung, S., et al. 2009. Prevalence of *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive and gonococcal antimicrobial susceptibility: an update in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.*

62:467-470.

- 6) Ohnishi, M., Ono, E., Shimuta, K., Watanabe, H., Okamura, N. 2010. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 54:3021-3023.
- 7) Salverda, M. L. M., de Visser, J. A. G. M., and Barlow, M. 2010. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstitution and clinical relevance. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:1015-1036.
- 8) High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* in Europe (France): novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. 2012. Unemo, M., Golparian, D., Nicholas, R., Ohnishi, M., Galloway, A., and Sednaoui, P. *Antimicrob. Agents Chemoter.* In press.

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 志牟田健、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、石川和弘、上田朋宏、亀岡博、古林敬一、安本亮二、川畑拓也、中山周一、大西真：「京都府と大阪府における 2010 年-2011 年に分離された淋菌株の MLST 及び NG-MAST 型別を用いた系統解析と淋菌の薬剤耐性の傾向について」日本感染症学会第 24 回学術大会. 東京、2011 年 12 月.

2. 発表論文

- 1) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 56:916-920.

Annual Report of Laboratory-based Collaboration Net

Work of Infectious Diseases in Asia

(H23-Shinkou- shitei-020)."

Chinese Center for Disease Control and Prevention

Prof. Dr. Xiao-Ping Dong

PI general in CCDC

1. Prevention of Enteric Infections and Food Borne Infectious Diseases

Title: Epidemiology of HFMD and genetic characterization of HEV71 and CVA16

Name of researcher: Wen-Bo Xu

Affiliation: National Institute for viral diseases control and prevention, China CDC, Beijing China

1. Surveillance of HFMD in mainland China

Attributed to the fulminate epidemics of HFMD associated with EV71 occurred in mainland China in 2008, HFMD was taken into the national notifiable surveillance as the 38th legally notifiable disease on May 2, 2008, managed as C class. It's compulsory for the doctors to report all the outpatients and inpatients of HFMD to the National Infectious Disease Information Management System (NIDIMS) on web within 24h upon diagnosis.

To reveal the pathogenic spectrum of HFMD, a proportion of clinical cases are required to be confirmed by laboratory. The three-level National Laboratory Network (excluding Hong Kong, Macau, and Taiwan) for HFMD was organized in 2008, including prefectural labs, provincial labs and national labs. To clarify the major enterovirus type associated with serious complications and fatalities, clinical specimens of all the severe and fatal cases should be collected for the detection of

enterovirus. Besides, for each county every month at least 5 mild cases should be confirmed by the laboratory, to reveal the spectrum of the pathogen mainly responsible for the current nationwide outbreaks. The lab results are updated on web by the lab staffs as soon as possible.

2. Epidemiological characteristics

In general, most of the cases were reported in spring, from March to June, which was followed by a mild autumn outbreak during Oct. to Dec. However, Because of the large territory and the diversity of the weather condition in China, the seasonal distribution in different area showed distinctive. For example, in south of China the epidemic in autumn is the dominant, but spring is the major peak in most of the provinces.

Primarily the children <15 years old are involved during the epidemic of HFMD, and ~90% cases are young children <5 years old. After infection, the young children <5 years old are more likely to progress to severe complications or fatality. More than 99% fatal cases are children <5 years old.

3. Molecular epidemiology of EV71 & CA16

From the lab network of HFMD, more than 3,000 enterovirus isolates from HFMD cases were collected and identified by the national lab, from 2008-2010. Molecular epidemiological studies on EV71 & CA16 were performed specifically, due to their dominant role in the current epidemics of HFMD in China. VP1 coding region is the

target region for our evolutionary analysis. All the data analyzed involve both the VP1 sequences determined by our lab and sequences of native isolates released in Genbank before 2010.

Evidence from both traditional and molecular epidemiology confirmed that the recent HFMD outbreak was an emerging one caused by EV71 of subgenotype C4. This emerging HFMD outbreak is associated with EV71 of subgenotype C4, circulating persistently in mainland China since 1998, but not attributed to the importation of new genotype. Originating from 1992, subgenotype C4 has been the predominant genotype since 1998 in mainland China, with an evolutionary rate of $4.6\sim 4.8\times 10^{-3}$ nucleotide substitutions/site/year. The phylogenetic analysis revealed that the majority of the virus during this epidemic was the most recent descendant of subgenotype C4 (clade C4a). It suggests that the evolution might be one of the potential reasons for this *native* virus to cause the emerging outbreak in China. However, strong negative selective pressure on VP1 protein of EV71 suggested that immune escape might not be the evolving strategy of EV71.

Based on the analysis of molecular epidemiology, CA16 could be divided into A, B genotype, further B1 and B2 subgenotype. All the reported isolates in china are belonging to B1 subgenotype. It's deduced that CA16 evolve slightly slower than EV71 by bioinformatics' analysis.

4. Pathogen spectrum

The laboratory network for HFMD was organized in 2008, responsible for the

pathogen identification of HFMD cases. The surveillance data from labs reveal that both EV71 and CA16 are the major pathogen for the current nationwide outbreak in China. However, the pathogen spectrum among provinces could be different each year, and the major pathogen in the same area could alternate over years. Nonetheless, > 80% severe cases and >90% fatal cases are associated with EV71 infections. Accordingly, EV71 should be the target to decrease the fatality during the epidemic of HFMD in China. In addition, data from some provincial labs indicate that other enterovirus as CA4, CA6 and CA10 also play non-negligible roles in the epidemic of HFMD.

Title: Laboratory based surveillance and outbreak detection for multiple foodborne diseases

Name of researcher: Biao Kan

Affiliation: National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

Summary:

Laboratory based surveillance of diarrheal diseases may improve the performance of disease surveillance and response by outbreak detection, source tracking and early warning. The pilot laboratory surveillance strategy will be explored within this project in some provinces in China. In the first year based on the framework of PulseNet China, three provincial CDC laboratories (Hunan, Gansu and Yunnan) were strengthened on the capacities of molecular subtyping of pathogens, including technical training of the staff and laboratory certification within the network, according to the procedure of PulseNet China. All these laboratories passed the survey and became the laboratory partner of PulseNet China. A workshop was held on the BioNumerics software system training, some provincial laboratories received training to learn the data analysis with BioNumerics, upload of PFGE finger printings to the national subtyping database. To ensure the quality of PFGE in the network, a proficiency test was performed in 18 provincial laboratories by distribution of

Salmonella and *Shigella* strains. All laboratories submitted the acceptable PFGE fingerprints within the set time.

In the central laboratory of network in China CDC, the new protocol for the PFGE subtyping of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A was developed. Paratyphoidal fever became public health problem in some provinces in recent years. In PulseNet International, a protocol is used for the subtyping of *Salmonella*. Difficult interpretation was found when using this protocol to analyze *S. paratyphi* A isolates from different years and provinces, for its poor discriminatory power. In this study, different restriction endonucleases and electrophoresis parameters were compared for the PFGE subtyping by using *S. Paratyphi* A strain panels. Two new protocols for the enzymes *Spe* I and *Xba* I showed higher discriminatory power, which may facilitate epidemiological analysis for more accurate case definition, and clonality study of *S. Paratyphi* A.

In the following years, based on the capacity building and quality control, the laboratory and hospital based molecular subtyping surveillance for diarrheal diseases will be performed exploringly in Yunnan province.

I. Purpose:

In China a pioneer laboratory-based surveillance system of bacterial diseases is under construction. The goal of this project is to establish the feasible multiple foodborne pathogen surveillance which can be used in the selected pioneer city health institutions, to strengthen the outbreak detection and response in the regions.

This year the goal is making effort to establish the essential capacities of molecular subtyping, usage of analysis software BioNumerics, and quality assurance of subtyping experiment in some network laboratories in the provincial level in PulseNet China, to prepare the abilities in laboratory-based molecular subtyping surveillance for diarrheal diseases in a region.

II. Methods:

Certification of Regional Laboratories . According to the procedure for becoming the laboratory member of the national molecular subtyping network for bacterial disease, PulseNet China, provincial CDC laboratories that plan to participate in the Network must submit their applications to PulseNet China, receive training and proficiency testing (PT) of molecular subtyping technology (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), receive the laboratory survey by the expert group organized by PulseNet China committee, then may get certification from PulseNet China Central Laboratory. In this year, provincial CDC laboratories of Hunan, Gansu and Yunnan were certificated by PulseNet China Central Laboratory.

Training of molecular subtyping experiment and software. PulseNet China Central Laboratory accepted trainees from the provincial laboratories that submitted applications to PulseNet China, to train the experiments of PFGE and basic usage of molecular subtyping data software BioNumerics. Workshop was conducted to train in particular the usage of BioNumerics and application in database management and analysis.

Proficiency testing. Two *Salmonella* Typhimurium strains and two *Shigella flexneri* strains were prepared and shipped to 18 provincial CDC laboratories, to request the feedback the PFGE patterns (in TIFF file) and the experiment record sheets within one month.

PFGE subtyping protocol optimization of Salmonella Paratyphi A. As a public health problem of paratyphoidal fever in some provinces of China, the foodborne and waterborne disease caused by *S. Paratyphi A*, although diarrhea is not the major symptom of patients, a new PFGE protocol was optimized for the poor subtyping ability of the PulseNet 1-day standardized PFGE protocol for the subtyping of *Salmonella* serotypes when used in *S. Paratyphi A* isolates subtyping. Strain panel of 33 isolates obtained in different years and provinces were used for the evaluation of the PFGE protocols. A pilot study was done using the restriction enzymes of *Xba*I, *Spe*I, *Bln*I (*Avr*II) and *Xho*I, with the first panel of 11 isolates and 10 different electrophoresis parameters, including the PulseNet 1-day standardized PFGE protocol for the subtyping of *Salmonella* serotypes, and those recommended by the CHEF Mapper software program based on the sizes of the restriction fragments. For each enzyme, three sets of parameters were finally selected for extensive evaluation using the 33-strain panel. The selected enzyme and electrophoresis was then expanded to 106 strains of *S. Paratyphi A* collected from 12 provinces in China between 1998 and 2010, to be compared the discriminatory ability with the PulseNet 1-day standardized PFGE protocol for the subtyping of *Salmonella* serotypes.

III. Results:

1) Certification of Regional Laboratories

To develop the network of PulseNet China, within this project we performed PFGE technical training for the staff from the laboratories of Hunan, Gansu and Yunnan provincial CDCs in PulseNet China Central Laboratory, to transfer the molecular subtyping technique to provincial CDC laboratories. Based on the procedure of PulseNet China, these CDC laboratories were also received the PTs by performing PFGE with the PT strains by these trained technicians in their own laboratories after their going back from the workshop in PulseNet China Central Laboratory. The PFGE patterns were feedback to the Central Laboratory and passed the assessment. The expert groups from PulseNet also did laboratory survey in these CDCs. The abilities of laboratories (including staff, PFGE skill, instruments, biosafety and so on), and communication with epidemiology group (including surveillance data exchange, staff communication, filed investigation procedure and so on) were surveyed. All these CDC laboratories were passed. All the survey documents were prepared and forwarded to the Administrative Steering Committee of PulseNet China, waiting for the validation and the assignment of cooperation agreement (memorandum of understanding) between PulseNet China and the provincial CDC.

2) Training of molecular subtyping experiment and software

In order to facilitate the networking of laboratory surveillance and promote the data communication in PulseNet China, PulseNet China held a training workshop on BioNumerics software (also the MLVA technique in this workshop) on August, 2011

in Beijing. Fifteen staff engaged in data analysis and communication in the regional central laboratories of Zhejiang, Jiangsu, Guangxi, Fujian, Chongqing, Sichuan, Hubei and Beijing participated in the training. The contents in the training included: BioNumerics software and data analysis, how to upload PFGE finger printings to central database.

3) Proficiency testing in 2011

In order to promote quality control and quality management during the implementation of molecular subtyping techniques in the provincial CDC laboratories of PulseNet China, and to promote the standardization of techniques, PulseNet China Central Laboratory prepared PT strains and evaluated the PFGE experimental capability of Jiangsu, Zhejiang, Hunan and some other CDC laboratories in 2011. Gansu and Yunnan CDC laboratories did not join the PT for their laboratory assessment was performed in the end of the year. The contents for examinations included PFGE patterns for *S. Typhimurium* and *S. flexneri*, and results were required from the testing within one month of sample receipt.

4) PFGE protocol optimization of *S. Paratyphi A* in PulseNet China Central Laboratory

We previously noticed that only a few subtypes were obtained in *S. Paratyphi A* when typed using the PulseNet protocol for *Salmonella* serotypes. For each selected restriction enzyme, a pilot study was done with the first panel of 11 isolates and using 10 different electrophoresis parameters. Then, for each enzyme, three sets of parameters with top three D values were selected for further comparisons with the