

检测恶性疟原虫富组蛋白 II 的疟疾诊断免疫层析试条的研制与评价

杨玥涛 高春花 汪俊云* 石锋 周晓农

【摘要】目的 建立一种快速、简便的诊断恶性疟的胶体金免疫层析试条方法,并对其进行评价。**方法** 克隆、表达恶性疟原虫富组蛋白 II 基因,以表达的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,制备单克隆抗体,筛选恶性疟原虫富组蛋白 II 特异的单克隆抗体,分别作为包被抗体和标记抗体,制备免疫层析试条。用该试条检测流行区非疟疾发热患者血样 80 份、内脏利什曼病患者血样 20 份和确诊的间日疟患者血样 75 份以评价其特异性;检测确诊的恶性疟患者血样 89 份,以评价其敏感性。**结果** 成功克隆并表达了恶性疟原虫富组蛋白 II,用重组蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体,采用杂交瘤技术共筛选出 5 株能高效分泌特异抗体的细胞株(效价为 1:12 800~1:102 400),抗体亚类均为 IgG₁。所有抗体均能唯一识别恶性疟原虫虫源蛋白组分,而与疫区非疟疾发热患者的红细胞组分无交叉反应。以筛选到的单克隆抗体制备的免疫层析试条检测疫区非疟疾发热患者、内脏利什曼病患者和间日疟患者血样的特异度为 97.7%(171/175),其中 20 份内脏利什曼病患者血样全部为阴性。检测恶性疟患者血样敏感度为 95.5%(85/89)。**结论** 制备了能识别天然恶性疟原虫富组蛋白 II 的特异性单克隆抗体,以此单抗为基础研制出的快速诊断恶性疟的胶体金免疫层析试条敏感度、特异度均较高。

【关键词】 恶性疟原虫;富组蛋白 II;单克隆抗体;免疫层析试条

Establishment and evaluation of colloid gold labeled immunochromatographic strip test for rapid diagnosis of falciparum malaria based on capturing antigen histidine-rich protein II of Plasmodium falciparum YANG Yue-tao, GAO Chun-hua, WANG Jun-yun*, SHI Feng, ZHOU Xiao-nong. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China

*Corresponding author, WANG Jun-yun, Email: wangjy0@yahoo.com.cn

Supported by the National Science and Technology Major Program (2012ZX10004220) and the Special Fund for Health Research in the Public Interest(201202019)

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a gold immunochromatographic strip test for rapid diagnosis of malaria infected by *Plasmodium falciparum*. **Methods** The *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II (HRP-II) gene was cloned and expressed. Recombinant HRP-II protein was used for immunizing mice to prepare monoclonal antibodies (McAbs). Monoclonal antibodies were screened, then conjugated with colloid gold as detecting reagent and immobilized on nitrocellulose in proper position. Blood samples from 80 febrile patients in endemic area of malaria, 20 patients with visceral leishmaniasis and 75 patients infected with *Plasmodium vivax* were used for evaluating the specificity. Eighty-nine blood samples of *falciparum* malaria patients were used for evaluating the sensitivity. **Results** The HRP-II gene was cloned and expressed successfully. Five cell lines of McAbs with high titer against HRP-II were obtained using the recombinant HRP-II as immunogen. Western blotting analysis showed that these McAbs recognized native *Plasmodium falciparum* protein without cross-reaction with constituents of red blood cell of febrile patients from endemic area of malaria. Two samples out of 80 febrile patients and 2 patients with *Plasmodium vivax* showed false positive reaction with a specificity of 97.7%(171/175), all the 20 samples from patients with visceral leishmaniasis were negative.

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2013.02.001

基金项目:国家科技部重大专项(2012ZX10004220);卫生行业科研专项经费资助项目(201202019)

作者单位:200025 上海,中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

*通信作者:汪俊云,Email:wangjy0@yahoo.com.cn

Eighty-nine blood samples of *Plasmodium falciparum* patients showed a sensitivity of 95.5% (85/89). **Conclusion** Monoclonal antibodies specific to *Plasmodium falciparum* HRP-II were established based on the recombinant HRP-II. The immunochromatographic strip test based on the recombinant HRP-II protein is a sensitive, specific, simple and rapid assay for *falciparum* malaria diagnosis.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; Histidine-rich protein II; Monoclonal antibodies; Immunochromatographic strip

疟疾是世界性的严重威胁人类生命和健康的公共卫生问题,准确快速的诊断方法对于该病的有效控制具有重要意义。近年来,在综合应用单克隆抗体技术、胶体金或染料标记技术和层析技术基础上发展起来的免疫层析试条技术是开发疟疾快速诊断技术的一个方向,并显示出良好的发展前景^[1]。富组蛋白 II (histidine-rich protein II, HRP-II) 是恶性疟原虫无性期合成并分泌至红细胞外的一种水溶性糖蛋白^[2]。研究表明,以 HRP-II 循环抗原作为靶分子检测恶性疟原虫感染是一种理想的方法^[3]。本研究以我国恶性疟原虫虫株为模板克隆并表达了恶性疟原虫 HRP-II 基因,以此重组蛋白制备了疟原虫 HRP-II 特异性单克隆抗体,研制了以抗原捕获法为基础的快速诊断恶性疟的胶体金免疫层析试条,并对其检测效果进行评价。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

高保真 *Pfu* 聚合酶 PCR 扩增试剂盒、内切酶 *Sam* I 购自立陶宛 Fermentas 公司,琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自北京索莱宝公司,pGEX-3X 载体购自美国 Amersham 公司,DH5 α 感受态细胞和 BL21 (DE3)感受态细胞购自北京 TIANGEN 公司,质粒抽提试剂盒购自美国 OMEGA 公司,谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂购自美国 GE 公司,RPMI1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司,新生小牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司,羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶结合物购自美国 ZYMED 公司,小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购自洛阳佰奥通实验材料中心,G 蛋白层析柱购自美国 GenScript 公司,硝酸纤维素膜 (NC)、交联释放垫 (GFCP203000)、吸水垫 (CF-SP223000) 和样品垫购自美国 Millipore 公司,氯金酸购自上海国药集团化学试剂有限公司,点膜器购自美国 Bio-Dot 公司,实验用骨髓瘤细胞系 SP2/0 为本实验室液氮保存。

1.2 实验动物

BALB/c 小鼠,清洁级,雌性,体重 18~20 g,购自

上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.3 血样

从云南疟疾流行区勐腊、景洪、镇康和耿马等县医院门诊部采集 244 份发热患者血样,镜检确认 80 份为非疟疾患者,164 份为疟疾患者 (75 份间日疟患者、89 份恶性疟患者)。取适量门诊发热患者的静脉血涂厚、薄片各 2 张,镜检,鉴别虫种并计算原虫密度,余下血样注入管壁涂有肝素的 1.5 ml 离心管,充分混匀,置 -20℃ 保存备用。

20 份病原学方法确诊的内脏利什曼病患者血样采自甘肃省陇南市武都区。

1.4 PCR 扩增 HRP-II 基因

根据文献 [4] 设计引物,序列如下,HRP-2F:5'-ACT CAA GCA CAT GT A GAT GAT G-3',HRP-2R:5'-TAA TGG CGT AGG CAA TGT GTG-3',引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。将采自云南省恶性疟患者的肝素抗凝全血按文献 [5] 方法进行处理,作为模板 PCR 扩增目的基因片段。反应条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 HRP-II 基因克隆表达和重组蛋白纯化

PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化后经 *Sam* I 酶切,与 pGEX-3X 表达载体连接,连接产物转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,置氨苄青霉素平板培养,挑取白色菌落进行 PCR 鉴定,阳性克隆送上海桑尼生物科技有限公司测序。将含有正确插入片段的重组质粒转化 BL21 (DE3)感受态细胞,培养过夜,随机挑选菌落,于含氨苄青霉素的 LB 培养基培养至吸光度值 $A_{600} \approx 0.6$ 时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 28℃ 诱导 4 h。收集细菌,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。用谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂亲和纯化重组蛋白。

1.6 单克隆抗体的制备与初步分析

1.6.1 免疫

按文献[6]方法,共免疫 3 只 BALB/c 小鼠,每只首次腹腔注射 100 μg (用生理盐水稀释至 0.25 ml)纯化的重组融合蛋白与 0.25 ml 福氏完全佐剂的混悬液,以后每隔 30 天注射 50 μg (用生理盐水稀释至 0.25 ml)纯化的重组融合蛋白与 0.25 ml 福氏不完全佐剂的混悬液 1 次,共 2 次,于处死小鼠的前 3 d 经尾静脉直接注射抗原 50 μg 加强免疫 1 次。并于首次注射后第 94 天处死小鼠,取脾进行细胞融合。

1.6.2 杂交瘤细胞的产生与筛选

SP2/0 瘤细胞与免疫鼠脾细胞的融合及杂交瘤细胞的克隆按常规方法进行^[6]。以上述纯化的重组融合蛋白和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)蛋白分别包被酶标板,对杂交瘤细胞培养上清进行常规 ELISA 检测抗体分泌,保留仅对重组融合蛋白反应的克隆。

1.6.3 单克隆抗体(McAb)免疫球蛋白亚类鉴定

按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒的说明书进行。采用间接 ELISA 方法,用杂交瘤细胞培养上清液加入试剂盒提供的条板中,分别与羊抗鼠 IgM、IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 进行反应以鉴定 McAb 免疫球蛋白亚类。

1.6.4 腹水制备与效价测定

每株杂交瘤细胞接种 5 只 BALB/c 小鼠,每只 BALB/c 小鼠腹腔注射 5×10^6 个杂交瘤细胞,1 周后随时观察小鼠的精神状态和腹水量,并取腹水。以纯化的重组融合蛋白包被酶标板,将腹水进行倍比稀释,第 1 稀释度为 1:100,用常规 ELISA 法测定腹水效价。

1.6.5 蛋白质印迹实验(Western blotting)

随机取云南恶性疟患者全血和云南发热患者全血各 10 份,等量混合分别配制成恶性疟患者混合全血和发热患者混合全血,各取 1 ml,1 600 $\times g$ 离心 10 min,除去上清和白细胞,收集红细胞,用 RPMI1640 培养基洗 3 次,按 5×10^8 个/ml 悬浮于 PBS 溶液中,加 Triton-100 至终浓度 1%,溶解 2 h,27 000 $\times g$ 离心 30 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳,然后转移至硝酸纤维素膜上,用含 5%脱脂奶粉的 PBS-T(含 0.5% Tween-20 的 PBS 溶液)溶液室温封闭 1 h,用 PBS-

T 洗涤 3 次,按 1:20 000 稀释度加入单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用 PBS-T 洗涤 3 次,加入用 PBS-T 稀释(1:10 000)的羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶结合物,室温摇 2 h,同法洗涤 3 次,再用 PBS 洗涤 1 次,用二氨基联苯胺(DAB)底物系统(DAB 50 mg, PBS 100 ml, 30% H_2O_2 10 μl)显色。

1.7 免疫层析试条的制备

采用 G 蛋白层析柱按产品说明书纯化单克隆抗体。柠檬酸三钠还原法制备胶体金和单克隆抗体标记胶体金的方法参照文献[7-8]进行。纯化的单克隆抗体分别作为标记抗体和包被抗体,与其他抗体进行配对,以筛选检测敏感性和特异性均佳的抗体对,用于制备试条。筛选的单克隆抗体(检测线)和羊抗鼠 IgG(质控线)分别喷涂在 NC 膜上适当位置制成试条。

1.8 检测条件选取

将适量细胞裂解液与适量疟疾患者血样、非疟疾发热患者血样和内脏利什曼病患者血样各 10 份加入 96 孔板的井中,反复吸吹数次,使红细胞充分溶解;将制备的试条插入溶解的血样中,待溶解的血样全部吸收后,再加数滴细胞裂解液,观察并记录检测结果。

1.9 试条性能的评价

对上述血样(包括疟疾患者血样、非疟疾发热患者血样和内脏利什曼病患者血样)采取单盲法检测,记录结果。检测结束后将试条检测结果与病原学方法检测结果进行比较,计算试条检测的敏感度和特异度。分别制备 3 批试条对同样的血样进行检测。

2 结果

2.1 HRP-II 基因的扩增与表达

以本研究设计的引物从云南恶性疟患者全血中扩增出一约 600 bp 的单一片段(图 1),经测序确定该片段长 659 bp,为 HRP-II 基因,编码 219 个氨基酸残基。重组质粒 pGEX-3X-HRP-II 经诱导成功表达了相对分子质量(M_r)约 48 000 的融合蛋白(图 2)。

2.2 单克隆抗体的制备与初步鉴定

以表达的重组蛋白免疫小鼠,取免疫小鼠的脾

细胞与 SP2/0 瘤细胞融合,经筛选获得 5 株高效分泌针对重组蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞,对相应单克隆抗体的亚类进行鉴定,表明均为 IgG1 亚类(表 1)。将这些杂交瘤细胞接种小鼠腹腔,均获得了含高效价单克隆抗体的腹水(表 1)。

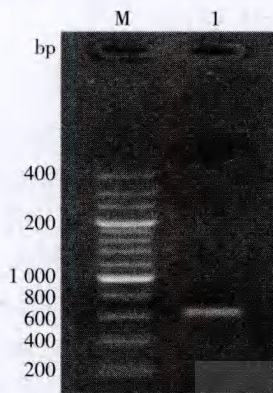


图 1 恶性疟原虫 HRP-II 基因的 PCR 产物

M: DNA 标志物, 1: 恶性疟原虫富组蛋白 II 基因

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis(1%)analysis on PCR product of *Plasmodium falciparum* HRP-II

M: DNA marker, 1: PCR product of HRP-II

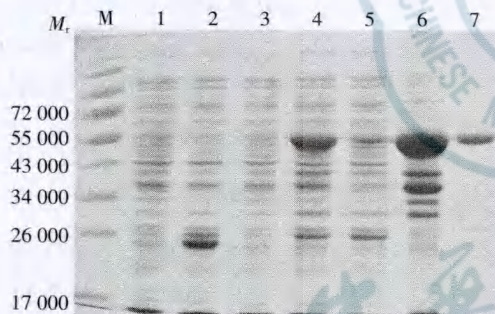


图 2 pGEX-3X-HRP-II 融合蛋白表达及纯化产物的 12%SDS-PAGE 鉴定

M: 蛋白质标志物, 1: 未诱导的 pGEX-3X 空质粒, 2: 经 IPTG 诱导的 pGEX-3X 空质粒, 3: 未诱导的 pGEX-3X-HRP-II, 4: 经 IPTG 诱导的 pGEX-3X-HRP-II, 5: 菌体超声处理后上清, 6: 菌体超声处理后沉淀, 7: 经谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂纯化后的 pGEX-3X-HRP-II 融合蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE (12%) analysis of pGEX-3X-HRP-II expressed in *E. coli* BL21 cells

M: Protein marker, 1: pGEX-3X empty vector before induction, 2: pGEX-3X empty vector after induction, 3: pGEX-3X-HRP-II whole cell without IPTG induction, 4: pGEX-3X-HRP-II with IPTG induction after cellular disruption, 5: Supernatant of cell pellet after sonication, 6: Precipitation of cell pellet after sonication, 7: Purified pGEX-3X-HRP-II fusion protein

用含单克隆抗体的腹水对恶性疟患者混合血样和云南非疟疾发热患者混合血样的红细胞组分进行

蛋白质印迹分析,结果显示,5 株单克隆抗体均能唯一识别恶性疟原虫组分的条带,而非疟疾发热患者的红细胞组分无交叉反应(图 3)。

表 1 单克隆抗体特性

Table 1 Characteristics of monoclonal antibodies

| 编号 Numbers | 单克隆抗体 McAb | ELISA 效价 Titer of ELISA | 免疫球蛋白亚类 Subclass of immunoglobulin |
|---------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 1 | D ₅ C ₂ | 51 200 | IgG ₁ |
| 2 | D ₅ F ₄ | 51 200 | IgG ₁ |
| 3 | C ₁₂ C ₂ | 12 800 | IgG ₁ |
| 4 | C ₆ H ₁₁ | 102 400 | IgG ₁ |
| 5 | C ₆ E ₉ | 102 400 | IgG ₁ |

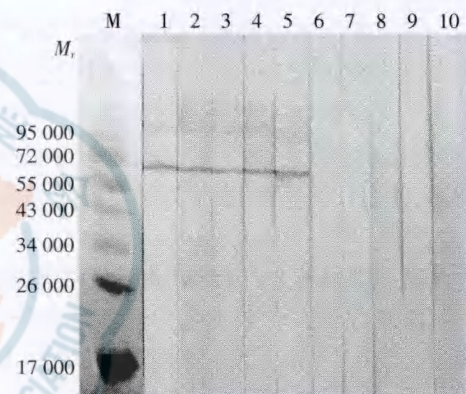


图 3 单克隆抗体 Western blotting 分析

M: 蛋白质标志物, 1~5: 恶性疟原虫虫源蛋白, 6~10: 非疟疾发热患者红细胞组分

Fig. 3 Western blotting analysis of monoclonal antibodies

M: Protein marker, 1-5: Proteins of cultured *Plasmodium falciparum*, 6-10: Red blood cells from febrile patients without malaria

2.3 单克隆抗体配对和血样检测条件

制备的 5 株单克隆抗体分别作为包被抗体和标记抗体进行配对实验,经比较选择单克隆抗体 C₆E₉ 标记胶体金作为检测抗体,选择 C₆H₁₁ 作包被抗体,检测效果最佳。每次检测取 15 μl 血样加 60 μl 细胞裂解液充分破碎红细胞。只要检测带出现即判为阳性,否则为阴性(图 4)。检测结果均在 10 min 内判断。

2.4 试条性能的评价

分别用 3 批制备的试条对疟疾患者血样、非疟疾发热患者血样和内脏利什曼病患者血样进行检测,批次间检测结果完全符合。检测 80 份疫区非疟疾发热患者血样、20 份内脏利什曼病患者血样和 75 份间日疟患者血样,有 171 份显示为阴性,特异度

为 97.7%；其中 20 份内脏利什曼病患者血样全部为阴性。检测 89 份恶性疟患者血样，85 份阳性，敏感度为 95.5%。

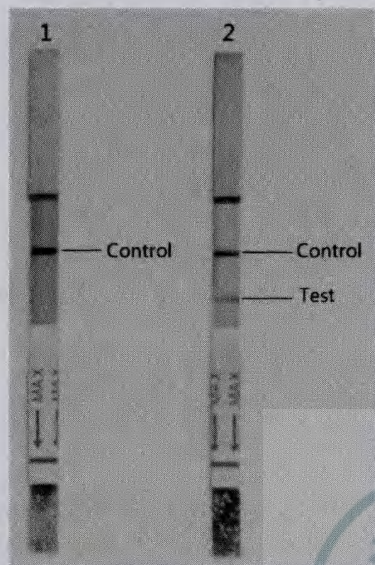


图 4 胶体金免疫层析试条检测结果

1: 非疟疾发热患者血样, 2: 恶性疟患者血样,

Control: 质量控制带, Test: 检测带

Fig. 4 Detecting results of the blood samples by the strip

1: Blood of febrile patients without plasmodial infection,

2: Blood of patients with *Plasmodium falciparum* infection,

Control: Quality control band, Test: Detection band

3 讨论

疟疾已成为全球性的公共卫生问题,尤其是恶性疟,至今仍威胁着热带、亚热带居民的健康。我国疟疾防治工作经过几代人的艰苦努力取得了巨大成就^[9]。目前,全国疟疾发病率已控制在较低水平,但近年来,云南边境地区受境外疟疾的影响日趋严重,海南山区仍是我国重要的恶性疟流行区。在恶性疟流行区,快速准确地诊断和及时治疗疟疾患者,不仅可降低恶性疟原虫的抗药性,也可防止恶性疟传播,降低患者的死亡率。当前疟疾诊断仍依赖血片镜检方法,费时费力,而且对镜检人员和设备的要求较高,基层常常难以满足。

迄今已有多种快速诊断恶性疟的免疫层析试条问世,如 ParaSight™ F 试剂盒(法国 Becton 公司)、Malaquick 试剂盒(澳大利亚 ICT 公司)等,这些试剂盒现场评估均取得较好的效果^[1],但价格昂贵,而疟疾多发于贫困国家和地区,患者难以负担较高费用,从而限制了这些试剂盒的推广和普及。

恶性疟原虫在其血液无性期能够合成、分泌一

种可溶性的抗原——HRP-II,通过特异的单克隆抗体检测 HRP-II 可以判断人体内恶性疟原虫的存在^[10]。本研究克隆、表达恶性疟原虫 HRP-II 基因,并在以该重组蛋白制备特异性单克隆抗体的基础上,研制了快速诊断疟疾的免疫层析试条。实验室检测证明,制备的免疫层析试条性能稳定,重复性好,在很大程度上弥补了现场工作中有经验的镜检人员不足的缺陷,以及漏检、误检的弊端。该试条具备其他诊断试条的一般共性,即操作快速、简便,无需任何仪器和设备;质量稳定,结果判断客观,样品无需冷藏等优点,具有广泛的应用前景。

祝卫东等^[11]在海南疟区门诊中对检测 HRP-II 诊断恶性疟的 ParaSight-F 及 ICT 两种方法进行了比较。ParaSight-F 方法的敏感度和特异度分别为 100% 和 87.1%, ICT 则分别为 94.7% 和 90.3%。本研究制备的试条实验室检测的敏感度和特异度分别为 95.5% 和 97.7%,与上述两种试条的性能类似,以后还需在现场扩大测试,作进一步评价。

本研究制备的试条只能特异性诊断恶性疟原虫,而对于非恶性疟原虫尚不能明确种类。所以在一些存在着多种疟原虫混合感染的地区的应用受到一定限制。发展能够区分诊断恶性疟和间日疟的同类产品应是今后的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(1): 66-78.
- [2] Howard RJ, Uni S, Aikawa M, et al. Secretion of a malaria histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes[J]. J Cell Biol, 1986, 103 (4): 1269-1277.
- [3] Beadle C, Long GW, Weiss WR, et al. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay[J]. Lancet, 1994, 343(8897): 564-568.
- [4] Wellem TE, Howard RJ. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(16): 6065-6069.
- [5] 汪俊云, 包意芳, 杨明涛, 等. 恶性疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体的制备[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 213-216.
- [6] Qu JQ, Bao YF. Dot-ELISA using monoclonal antibodies for identification of *Leishmania donovani*[J]. Chin Med J, 1987, 100 (10): 823-826.
- [7] Roe CD, Courtoy PJ, Baudhuin P. A model of protein-colloidal

- gold interaction[J]. J Histochem Cytochem, 1987, 35(11): 1191-1198.
- [8] Warchol JB, Brelińska R, Herbert DC. Analysis of colloidal gold methods for labelling proteins[J]. Histochemistry, 1982, 76 (4): 567-575.
- [9] 汤林华. 中国的疟疾: 从控制走向消除[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2009, 36(5): 258-265.
- [10] A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of *falciparum* malaria. WHO informal consultation on recent advances in diagnostic techniques and vaccines for malaria [J]. Bull World Health Organ, 1996, 74(1): 47-54.
- [11] 祝卫东, 汤林华, 郑香, 等. 两种方法检测富组蛋白 II 诊断恶性疟的比较[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 12(1): 9-11.
- (收稿日期: 2012-12-04)
(本文编辑: 高石)

· 消息 ·

第五届北京热带医学与寄生虫学论坛通知

为促进热带医学与寄生虫学领域的学术交流,首都医科大学附属北京友谊医院、北京热带医学研究所定于 2013 年 4 月 17 日(周三)—19 日(周五)在北京举办“第五届北京热带医学与寄生虫学论坛”。届时将邀请国内相关领域知名专家共聚一堂,就热带医学与寄生虫学方面国内最为关注的问题作专题报告,并从不同角度切磋相关热点问题,以繁荣学术发展,增进同仁交流。本届论坛已列入国家级继续医学教育项目,与会代表将获得国家级 1 类学分。欢迎踊跃报名。有关本届论坛报名、注册等事宜请与组委会联系。

联系人: 谷俊朝

联系电话: 010-63025849, 63138570

Email: reyansuo2008@sohu.com

首都医科大学附属北京友谊医院
北京热带医学研究所

2013-02-19