

## 基因芯片技术在结核耐药检测中的应用进展

吴 铮,许建中

(第三军医大学附属西南医院骨科 400038 重庆市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.11.16

中图分类号: R446, R529.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-11-0863-04

近年来,由于人口数量及流动性的增加,耐多药结核(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)特别是广泛耐药结核(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)的蔓延,结核病(tuberculosis, TB)再次对国际公共卫生构成严重威胁。1993年4月,WHO宣布“全球结核病处于紧急状态”;2009年WHO报告在全球22个结核及耐药结核高负担国家中我国位列第二,仅次于印度<sup>[1]</sup>。

结核病临床化疗方案的选择往往是经验性的,如果结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)存在耐药性,则会使整个疗程大大延长,甚至对临床治疗效果及耐药结核病的控制产生不利影响<sup>[2]</sup>。准确及时的MTB耐药检测是指导临床早期开展个体化药物治疗、控制结核病流行的前提。被誉为“金标准”的MTB传统耐药检测多以罗氏培养法为基础,再采用绝对浓度法行药敏检测,整个检测过程耗时长(8~12周),且培养阳性率低<sup>[3]</sup>,很难用于指导结核病的临床治疗。以BACTEC 960、BACT/ALERT 3D为代表的MTB快速培养耐药检测系统可以明显缩短检测耗时,但目前仅能针对5种一线抗结核药物进行耐药检测,且费用昂贵,限制了其临床应用<sup>[4,5]</sup>。基因芯片技术自20世纪90年代问世以来,因其快速、准确、高效、操作简便等优点得到广泛应用和发展。随着MTB的耐药相关基因及相应突变位点的相继发现,基因芯片技术在MTB耐药检测中的应用已经受到国内外众多学者的广泛关注。

## 1 基因芯片技术应用于MTB耐药检测的现状

至今为止,用于抗结核治疗的5种一线药物及二线药物中包括氟喹诺酮类的12个耐药相关基因已被分析鉴定(表1)<sup>[6-10]</sup>。利用MTB的耐药性与基因突变有关的分子机制,直接针对耐药相关的热点基因来设计芯片进行检测,根据检测位点的突变情况即可判断MTB的耐药性。

### 1.1 利福平(RFP)

RFP是抗结核联合化疗中的关键药物,因其快速杀菌的特性可缩短结核病疗程,故MTB对RFP耐药就意味着疗程可能延长,预后较差。Tat'kov等<sup>[11]</sup>研究发现某些地

表1 结核分支杆菌耐药相关基因

| 抗结核药物    | 耐药相关基因 | 编码对象                |
|----------|--------|---------------------|
| 利福平(RFP) | rpoB   | RNA聚合酶 $\beta$ 亚基   |
|          | katG   | 过氧化氢酶-过氧化物酶         |
|          | inhA   | 烯酰基载体蛋白还原酶          |
|          | ahpC   | 烷基过氧化氢酶             |
|          | kasA   | $\beta$ -酮酰基运载蛋白裂合酶 |
| 异烟肼(INH) | oxyR   | 氧化-应激应答反应调节蛋白OxyR   |
|          | pncA   | 吡嗪酰胺酶               |
|          | embB   | 阿拉伯糖基转移酶            |
|          | rrs    | 核糖体30S亚基16SrRNA     |
| 链霉素(SM)  | rpsL   | 核糖体30S亚基S12蛋白       |
|          | gyrA   | DNA回旋酶A亚基           |
| 氟喹诺酮类    | gyrB   | DNA回旋酶B亚基           |

区94%的RFP耐药株同时对异烟肼(INH)耐药,提示RFP耐药性的存在可能成为判断MDR-TB的依据之一。

**1.1.1 耐药机制** RFP通过与MTB的RNA聚合酶 $\beta$ 亚基结合,阻碍信使RNA的合成、干扰细菌的基因转录、抑制菌体蛋白的合成,发挥抗菌作用。如果编码 $\beta$ 亚基的rpoB基因发生突变,导致RFP不能与 $\beta$ 亚基结合,则使MTB耐RFP<sup>[10]</sup>。rpoB基因在耐RFP菌株中的突变率为96%左右,且突变集中于rpoB 507~533位的27个密码子(81bp)组成的区域内,最常见的位点是531、526、516<sup>[12]</sup>。有报道称,rpoB突变位点的不同与MTB对RFP耐药的程度有一定关联性,突变发生在531、526位的菌株多为RFP高度耐药株<sup>[13]</sup>。

**1.1.2 基因芯片应用现状** 得益于RFP耐药基因的相关研究,基因芯片用于结核耐药检测的探索研究便主要针对RFP耐药展开。20世纪90年代末,Gingeras等<sup>[14]</sup>利用rpoB基因保守区705bp的核苷酸探针针对44株MTB利福平耐药分离株(基于传统药敏试验)进行检测,发现40株存在rpoB基因的突变,涉及12种突变类型、8个密码子,突变检出率为90.9%。随后,Troesch等<sup>[15]</sup>、Head等<sup>[16]</sup>相继进行了类似研究,结果与前者相符。这些研究初步证实基因芯片用于结核耐药检测的敏感性、特异性均较高,且检测结果与基因测序完全一致,为后来相关研究的广泛开展提供了

第一作者简介:男(1985-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68754164 E-mail:happywz@sina.com

通讯作者:许建中 E-mail:xjzslw@163.com

参考。

近年来的研究显示,基于 *rpoB* 基因设计芯片在 RFP 耐药检测中的敏感性高于 96%、特异性高于 95%,且突变基因的分析结果与基因测序相符<sup>[17-20]</sup>,证明基因芯片技术对 RFP 的耐药检测准确性极高,具备广泛临床应用的条件。

## 1.2 INH

INH 自问世以来一直是重要的一线抗结核药物,其易渗透进入吞噬细胞,对细胞内外的 MTB 均具杀灭作用。近年来 MTB 对其耐药率显著上升,使结核病的防治工作面临严峻挑战<sup>[10]</sup>。

**1.2.1 耐药机制** INH 在 MTB 菌体内经“过氧化氢酶-过氧化物酶”氧化形成具有活性的中间产物异烟酸,可抑制分支菌酸合成的相关酶,导致 MTB 细胞壁破损<sup>[10]</sup>。目前已知的 INH 耐药相关基因是 *katG*、*inhA*、*kasA*、*ahpC* 和 *oxyR*。*katG* 是“过氧化氢酶-过氧化物酶”的编码基因;*inhA* 编码的“烯酰基载体蛋白还原酶”和 *kasA* 编码的“ $\beta$ -酮酰基运载蛋白裂合酶”均参与分支菌酸的合成,也是异烟酸作用的酶靶位<sup>[5]</sup>;*ahpC*(编码烷基过氧化氢酶)和 *oxyR* 共同参与和调节 MTB 的氧化-应激应答<sup>[10]</sup>。基因分析研究认为,*katG*、*inhA* 的突变和 *katG* 的完全缺失是 MTB 对 INH 产生耐药性的主要原因,在 INH 耐药株中 *katG*、*inhA* 的突变率分别为 50%~70%和 10%~35%<sup>[21]</sup>。其中 *katG* 315 位的突变与耐药有关<sup>[22]</sup>,而 *katG* 463 位的突变未发现与耐药的明显相关性<sup>[23]</sup>。*katG* 完全缺失的发生率很低,可能是由于其在 MTB 的生存中起着重要作用,且缺失均出现在 INH 高度耐药株中<sup>[7,22]</sup>。

**1.2.2 基因芯片的相关研究** 设计覆盖 *katG*、*inhA*、*ahpC* 的基因芯片对 INH 耐药株进行检测并与传统药敏对比,敏感性可达 84%~86.5%、特异性为 100%<sup>[12,24]</sup>。如芯片探针仅覆盖 *katG*、*inhA*,其检测敏感性为 84.1%~91%<sup>[2,18]</sup>,而特异性的报道差别较大,为 60%<sup>[2]</sup>和 100%<sup>[18]</sup>。所有研究均显示基因芯片检测结果与基因测序一致。近年国外学者在基因芯片检测研究中发现,约 90%的 INH 耐药菌株存在 *katG* 突变<sup>[12,20]</sup>,明显高于先前 50%~70%<sup>[21]</sup>的基因测序结果,提示近年 *katG* 基因突变的发生率可能有所提升,这将使针对 *katG* 的基因芯片耐药检测更为准确可信。提高探针的覆盖面,尽可能全面地检测 INH 耐药相关基因,可达到较高的准确性。

## 1.3 吡嗪酰胺(PZA)

**1.3.1 耐药机制** PZA 进入 MTB 菌体内,在吡嗪酰胺酶的作用下转化成吡嗪酸发挥抗菌作用。吡嗪酰胺酶的编码基因是 *pncA*,其突变可使吡嗪酰胺酶的活力下降或消失,导致 MTB 对 PZA 耐药<sup>[10]</sup>。目前研究认为<sup>[25-27]</sup> 72%~98%的 PZA 耐药株是由于 *pncA* 基因突变或碱基缺失所致,常见于 47、85 位的突变及 70 位的 G 缺失。此外一部分耐 PZA 的 MTB 菌株检测不到 *pncA* 的突变或吡嗪酰胺酶仍有活力,提示还应有其他耐药机制存在。

**1.3.2 基因芯片的研究现状** 由于 PZA 药物活性受环境 pH 值的影响很大,以细菌培养为基础的传统药敏检测方法很难用于 PZA 的耐药检测<sup>[10,28]</sup>。针对 *pncA* 设计基因芯片进行耐药检测,不同学者在 PZA 耐药株中发现突变的比例为 58%<sup>[28]</sup>和 100%<sup>[29]</sup>。值得一提的是,基因芯片对 PZA 敏感株的检测均未发现 *pncA* 的突变,且所有检测结果与 DNA 测序完全符合<sup>[28,29]</sup>。由此看到,在传统检测手段难以用于 PZA 耐药检测的背景下,随着相关研究的不断完善,基因芯片对 PZA 耐药检测必会拥有极大的临床应用前景。

## 1.4 乙胺丁醇(EMB)

**1.4.1 耐药机制** EMB 是一种阿拉伯糖类物,作用于 MTB 阿拉伯糖基转移酶,影响细胞壁分支菌酸-阿拉伯半乳糖-蛋白聚糖复合物形成,引起 MTB 细胞形态学改变而发挥抗菌作用。MTB 耐 PZA 主要与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 *embB* 的突变有关。*embB* 的突变可使糖基转移酶结构改变,影响 EMB 和糖基转移酶的相互作用从而产生耐药。据报道有 69%的 EMB 耐药株存在 *embB* 基因的突变,其中 89%都发生在 306 位密码子;但仍有 30%的耐药株缺乏 *embB* 突变,说明存在其他耐药机制<sup>[10]</sup>。

**1.4.2 基因芯片的研究现状** 国外学者<sup>[2]</sup>针对 *embB* 设计的基因芯片对 EMB 耐药株进行检测的敏感性为 98%、特异性为 89%。国内学者<sup>[30]</sup>报道的特异性(90.2%)与前者基本一致,而敏感性(61.4%)相对较低。由于基因芯片应用于 EMB 耐药检测所受关注较少,其临床应用的可行性有必要通过大样本研究证实。

## 1.5 链霉素(SM)

**1.5.1 耐药机制** SM 是在核糖体水平干扰原核生物蛋白质合成的氨基糖甙类抗生素,其作用于 MTB 的核糖体,干扰、抑制蛋白质的合成而发挥抗菌作用。SM 主要作用部位在核糖体 30S 亚基(由 21 种核糖体蛋白和 16SrRNA 组成),MTB 对 SM 的耐药主要与核糖体 30S 亚基 S12 蛋白的编码基因 *rpsL* 及 16SrRNA 的编码基因 *rrs* 的突变有关。耐 SM 的 MTB 临床分离株发生 *rpsL* 和 *rrs* 基因突变率约为 80%,而敏感株均未发现该基因突变。*rpsL* 的突变位点常见于 43、88 位;*rrs* 的突变位点主要集中在 530 环区和 904 位,常见有 491、512、513、516、903 位<sup>[10]</sup>。

**1.5.2 基因芯片的研究现状** 利用基因芯片分析 MTB 对 SM 耐药性的敏感性为 93%<sup>[2]</sup>、88.7%<sup>[30]</sup>,特异性为 73%<sup>[2]</sup>、100%<sup>[30]</sup>。现有研究初步表明,基因芯片用于 SM 耐药检测的准确性较高,有较大的临床应用潜力,但是同样需要大样本研究进一步证实。

## 1.6 氟喹诺酮类药物

氟喹诺酮类药物主要指第三代和第四代喹诺酮类药物,目前已用于结核病临床治疗的主要是第三代喹诺酮类药物以及司帕沙星(第四代)。

**1.6.1 耐药机制** 氟喹诺酮类药物通过干扰 MTB 的 DNA 回旋酶(Gyrase),使 DNA、RNA 以及蛋白质的合成受扰,

起到杀菌作用。DNA 回旋酶是由两个 A 亚基和两个 B 亚基组成的四聚体,编码基因分别为 *gyrA* 和 *gyrB*, 目前已知 MTB 对氟喹诺酮类药物产生耐药性即是上述 2 个基因的突变所致<sup>[10]</sup>。

**1.6.2 基因芯片的研究现状** 目前尚无研究报道基因芯片用于氟喹诺酮类药物耐药检测的敏感性、特异性等指标。但有研究显示,在同时对 RFP 和 INH 耐药的 MDR-TB 中,仍有 23.5% 的菌株对氟喹诺酮类药物显示出敏感性<sup>[31]</sup>。作为主要的二线抗结核药物之一,氟喹诺酮类药物在 MDR-TB 治疗中必将发挥越来越大的作用。因此,开展相关研究评价基因芯片用于此类药物耐药检测的临床应用价值,对于今后指导结核病的临床治疗具有长远意义。

## 2 展望

自 1998 年 Cole 等<sup>[32]</sup>首次报道 MTB 标准株 H37Rv 的全基因序列以来,人们从基因水平上分析 MTB 耐药性的探索从未停止。面对日趋严重的耐药结核病疫情,为使药物治疗更加及时、有效,我们迫切地需要将“基因芯片结核耐药检测技术”不断完善,并广泛应用于临床。

首先,进一步提高基因芯片耐药检测的准确性是今后研究的主要任务之一,而继续深入探索 MTB 的耐药相关基因,扩大芯片探针的覆盖范围,无疑是提高敏感性、特异性的重要途径。其次,目前基因芯片耐药检测主要针对 5 种一线抗结核药物,今后的研究需扩大基因芯片耐药检测的药物种类,并设计可同时检测多个、甚至全部抗结核药物的耐药检测芯片,以满足临床需要。此外,目前绝大多数研究中的 MTB 菌株均来自肺结核患者的痰液样本。众所周知,骨关节结核是 MTB 全身感染的局部表现,是发病率最高的肺外结核,从 MDR-TB 流行病学观点来看,骨关节结核的 MDR-TB 流行扩展是不可避免的。将有效的药物治疗贯彻整个治疗过程的始终才是取得治疗成功的关键,绝非手术治疗可以替代<sup>[33,34]</sup>。因此,利用基因芯片技术快速、准确地检测骨关节结核病灶中 MTB 菌株的耐药性,将直接指导临床对骨关节结核开展早期、有效的个体化药物治疗,对缩短疗程、降低复发率、节省治疗费用均有积极作用,这也是今后研究的一个重要方向。

综上所述,目前基因芯片用于结核耐药检测的研究尚有诸多不足,但以其作为快速耐药检测手段指导临床开展早期、有效的药物治疗,和传统药敏检测互为补充,是完全可行的。随着研究的不断深入和技术的不断完善,快速、准确的基因芯片结核耐药检测必将广泛应用于临床,成为指导结核病个体化药物治疗的“利器”。

## 3 参考文献

1. WHO report 2009: Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. World Health Organization, 2009.
2. Yasuo Shimizu, Kunio Dobashi, Yoko Yoshikawa, et al. Five-antituberculosis drug-resistance genes detection using array

system[J]. J Clin Biochem Nutr, 2008, 42(3): 228-234.

3. 张泽华, 万东勇, 许建中, 等. 结核分枝杆菌快速培养和常规药敏试验在脊柱结核治疗中的应用 [J]. 中华骨科杂志, 2008, 28(12): 988-991.
4. Garrigo M, Aragon LM, Alcaide F, et al. Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1766-1770.
5. Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, et al. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1109-1114.
6. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis [J]. Science, 1994, 263(5144): 227-230.
7. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis [J]. Nature, 1992, 358(2): 591-593.
8. Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(3): 719-723.
9. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Tuberc Lung Dis, 1998, 79(1): 3-29.
10. 张光铂, 吴启秋, 关骅, 等. 主编. 脊柱结核病学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2007. 142-156.
11. Tat'kov SI, Sivkov AIu, Boldyrev AN, et al. Evaluation of biochips for the rifampin resistance detection of M. tuberculosis in strains isolated at the Novosibirsk and Tomsk regions [J]. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 2007(3): 9-15.
12. Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis [J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(7): 531-539.
13. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, et al. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4): 1289-1294.
14. Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA arrays [J]. Genome Res, 1998, 8(5): 435-448.
15. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high density DNA probe arrays [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(1): 49-55.



16. Head SR, Parikh K, Rogers YH, et al. Solid-phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis [J]. Molecular and Cellular Probes, 1999, 13(1): 81-87.
17. Sougakoff W, Rodrigue M, Truffot-Pernot C, et al. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(4): 289-294.
18. Kim SY, Park YJ, Song E, et al. Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in Mycobacterium tuberculosis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 54(3): 203-210.
19. Caoili JC, Mayorova A, Sikes D, et al. Evaluation of the TB-Biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2378-2381.
20. Isakova ZhT. Fast identification of rifampicin- and isoniazid resistance of M. Tuberculosis strains by the "TB-biochip" test system [J]. Georgian Med News, 2008, (158): 15-19.
21. Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, et al. Genomic mutations in the katG, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Kwazulu Natal, South Africa [J]. Tuber Lung Dis, 2000, 80(1): 47-56.
22. 陈曦, 马珂, 金奇, 等. 耐异烟肼结核分枝杆菌临床分离株耐药相关基因突变研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(4): 250-253.
23. Haas WH, Schilke K, Brand J, et al. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of Mycobacterium tuberculosis complex from Africa [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(7): 1601-1603.
24. Zhang SL, Shen JG, Xu PH, et al. A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by a multiplex probe array [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(4): 1262-1271.
25. Wade MM, Volokhov D, Peredelchuk M, et al. Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 49(2): 89-97.
26. Rodrigues VF, Telles MA, Ribeiro MO, et al. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis in Brazil [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 444-446.
27. Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, et al. Spectrum of pncA mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates obtained in Latvia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(8): 3209-3210.
28. Denkin S, Volokhov D, Chizhikov V, et al. Microarray-based pncA genotyping of pyrazinamide-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis [J]. J Med Microbiol, 2005, 54 (Pt 12): 1127-1131.
29. Wade MM, Volokhov D, Peredelchuk M, et al. Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 49(2): 89-97.
30. 吴雪琼, 张琼, 张俊仙, 等. 应用基因芯片分析结核分枝杆菌常见耐药基因型的研究 [J]. 中国防痨杂志, 2006, 28(1): 4-10.
31. Nosova Elu, Galkina Kl, Antonova OV, et al. Use of molecular-biological microchip TB-BIOCHIP-2 for detecting of Mycobacterium tuberculosis with multidrug resistance to fluoroquinolones in patients with new detected and chronic tuberculosis [J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2008, (3): 16-19.
32. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence [J]. Nature, 1998, 393(6685): 537-544.
33. 许建中. 对脊柱结核手术指征和手术方式的再认识 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(12): 889-890.
34. 吴启秋, 潘毓萱, 毕志强, 等. 骨关节结核病灶中耐多药结核分枝杆菌对疗效的影响 [J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(7): 431-433.

(收稿日期: 2009-09-24)

(本文编辑 李伟霞)

## 消息

### 第二届西部经皮椎体成形及相关技术学习班通知

由重庆医科大学附属第二医院骨科主办的“第二届西部经皮椎体成形及相关技术学习班”将于2009年12月18日~20日在重庆举行。

重医二院骨科是国内开展经皮椎体成形术最早的科室之一,对经皮椎体成形及相关技术进行了系统的研究和临床应用,形成了自己的特色。本次学习班将介绍该技术的发展历史、技术规范、手术技巧、并发症预防和相关技术拓展等几个专题。会议形式以专家授课为主结合手术演示和典型病例讨论。届时将邀请国内知名学者与重医二院专家共同授课。学习班结业将授予重庆市继续教育学分。

会议时间: 2009年12月18日报到, 19~20日学习班。会议地点: 重庆市解放碑大世界酒店。注册费(含餐费): 1000元。会议咨询: 重庆医科大学附属二院骨科。

联系人: 晏铮剑; 电话: 13983983139; E-mail: cyeygk@gmail.com。